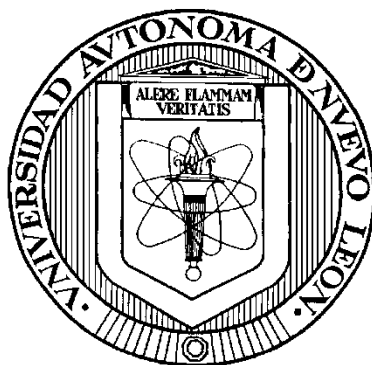


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE ANTICUERPOS DE CADENA SENCILLA  
CONTRA LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO**

**Por**

**KEVIN CHRISTIAN BERMEA DE LEÓN**

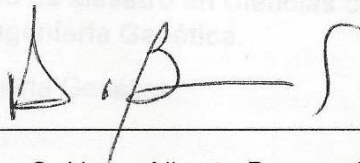
**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Diciembre, 2015**

## DESARROLLO DE ANTICUERPOS DE CADENA SENCILLA

### CONTRA LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

Aprobación de la Tesis:



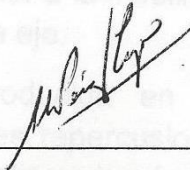
Dr. en C. Hugo Alberto Barrera Saldaña

Director de Tesis



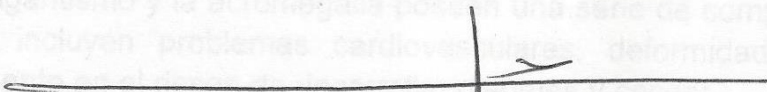
Dr. en C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez

Co-Director de Tesis



Dr. en C. Antonio Alí Pérez Maya

Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Subdirector de Estudios de Postgrado

## **RESUMEN**

**Kevin Christian Bermea de León      Fecha de graduación: Diciembre, 2015**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

**Área de Estudio:** Ingeniería Genética

**Título del estudio:**

### **DESARROLLO DE ANTICUERPOS DE CADENA SENCILLA CONTRA LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO**

**Introducción.** La hormona de crecimiento humana (hGH) tiene como función más destacada el fomentar el crecimiento lineal de nuestro cuerpo. Su producción y liberación es inducida por el hipotálamo a través de la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) e inhibida por la somatostatina. Una vez secretada, la hormona estimula su receptor (GHR) en el hígado, lo que hace que se libere el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), siendo este último el principal efector de este eje.

Cuando la hGH es producida en exceso aparecen diversas patologías con importantes repercusiones clínicas, como lo son el gigantismo y la acromegalia, además de que también se ha visto producción local de esta hormona en algunos cánceres, como el cáncer de mama.

El gigantismo y la acromegalia poseen una serie de complicaciones que incluyen problemas cardiovasculares, deformidades óseas, aumento en el riesgo de desarrollar diabetes y cáncer.

Debido a que la principal causa de sobreproducción de hGH son los tumores hipofisarios, la terapia inicial para el gigantismo y la acromegalia consiste en la escisión quirúrgica de estos tumores. Sin embargo, la tasa de éxito oscila entre un 50-80% y el resto de los pacientes deben someterse a una terapia farmacológica de por vida.

Actualmente existen tres grupos de fármacos los cuales se administran en estos pacientes, los antagonistas del GHR, análogos de la somatostatina y agonistas de la dopamina.

La eficacia del tratamiento se monitorea a través de los niveles de IGF-1. Desafortunadamente se necesita la combinación de por lo menos dos fármacos para alcanzar los niveles de IGF-1 óptimos y evitar las complicaciones de estas enfermedades.

Los fármacos actuales se asocian a una serie de efectos adversos o limitaciones que incluyen molestias digestivas y aumento en el riesgo de desarrollar colecistolitiasis para el caso de los análogos de la somatostatina; alto costo para el caso de los antagonistas del GHR y pobre eficacia como monoterapia para la carbegolina.

**Objetivo.** Este proyecto pretende desarrollar un anticuerpo de dominio único contra la hGH y con éste, dar pauta para el desarrollo de un nuevo inhibidor de la hGH con un blanco que no se había intentado antes, el secuestro directo de la hGH.

**Metodología.** Para el desarrollo de esta molécula se partió de una biblioteca de anticuerpos de dominio único (sdAbs) inmune y una nativa, ambas provenientes del tiburón cornudo *Heterodontus francisci*, a estos anticuerpos se les conoce como nuevos receptores de antígeno variables (VNARs).

Los anticuerpos provenientes de esta especie tienen como ventaja una mayor producción, mayor solubilidad, menor tendencia a la agregación y mayor termoestabilidad, lo cual facilita su producción biotecnológica.

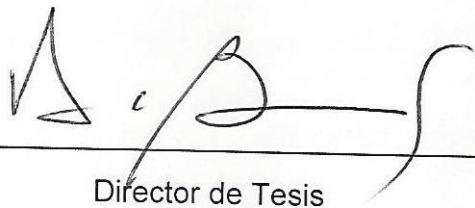
La selección de los anticuerpos se realizó utilizando la técnica de despliegue de fagos. Una vez terminadas las rondas de selección se enviaron a secuenciar los insertos para corroborar que la secuencia aminoacídica del producto proteico correspondiera a la de un VNAR.

A partir de las clonas obtenidas se extrajo el vector y se introdujo a una cepa de *Echerichia coli* para su producción biotecnológica. Finalmente fueron confrontados contra la hGH en un ensayo de ELISA para evaluar su capacidad de reconocimiento.

**Resultados.** Se obtuvieron cuatro candidatos con la estructura característica de los VNARs. De éstos, uno presentó señal positiva en un ensayo de reconocimiento.

**Conclusión.** Se logró obtener un sdAb con capacidad de reconocimiento hacia la hGH.

**Perspectivas.** Seguir tamizando clonas, optimizar la producción y hacer pruebas de afinidad con éste y otros posibles candidatos obtenidos en futuros tamizajes y posteriormente pasarlos a ensayos de inhibición de la actividad de la hGH en un modelo *in-vitro* de diferenciación adipocítica y un modelo *in-vivo* de inhibición de la actividad de la hGH en ratas hipofisectomizadas a las cuales se le administra esta hormona.

  
Director de Tesis

Dr. en C. Hugo Alberto Barrera Saldaña

El presente trabajo titulado "Desarrollo de anticuerpos de cadena sencilla contra la hormona del crecimiento humano" fue realizado por el M.C.P. Kevin Christian Bermea de León en dos diferentes centros de investigación. El laboratorio de Biotecnología del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de la División de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, en Ensenada, Baja California.

## *Dedicatoria*

*Quiero dedicar este trabajo a mis padres y a mi hermano, quienes me apoyaron en toda mi formación académica, y agradecerles por todos los consejos que me han dado y que me han hecho ser una persona de bien.*

## *Agradecimientos*

*Quiero agradecer más que a nadie a mi familia que me apoyó en la decisión de estudiar una maestría en ciencias. A Jorge mi excompañero de carrera que fue gracias a él que conocí estos posgrados en ciencias. A mis compañeros de generación con quienes estuve en los buenos y malos momentos durante el posgrado. A los estudiantes de medicina voluntarios, al personal de servicio social y del laboratorio que me ayudaron a sobrepasar los obstáculos a los cuales me enfrenté en los experimentos.*

*A al personal del CICESE en Ensenada, con especial mención a Pavel y Olivia quienes incondicionalmente me apoyaron para llevar a cabo este trabajo invirtiendo gran cantidad de su tiempo y al Dr. Licea quien me permitió realizar parte de este proyecto en su laboratorio.*

*Quiero además agradecer a mi comisión de tesis, el Dr. Ascacio y el Dr. Pérez me brindaron asesoría técnica indispensable para llevar a cabo mis experimentos. Por último quiero agradecer al Dr. Barrera quien no solo me enseñó sobre el lado experimental de la ciencia, gracias a él aprendí aspectos administrativos del ámbito científico los cuales son importantes para mi formación como investigador.*

## LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1.	Estructura básica de un anticuerpo.	23
2.	Estrategia general para el desarrollo de los VNARs anti-hGH.	35
3.	ELISA practicado al suero de tiburón.	42
4.	Extracción de ARN del bazo del tiburón.	43
5.	RT-PCR del ARNm del bazo del tiburón.	44
6.	Índice output/input de las rondas de selección en la biblioteca inmune.	46
7.	ELISA de fagos de las rondas de selección de la biblioteca inmune.	46
8.	PCR en colonia de las clonas de las rondas de selección 3 y 4 de la biblioteca inmune.	48
9.	Índice output/input de las rondas de selección de la biblioteca nativa.	49
10.	PCR en colonia de las clonas de las rondas de selección 3 y 4 de la biblioteca nativa.	50
11.	Western-blot de la selección por producción.	50
12.	Western-blot de la inducción y extracción de proteínas de periplasma.	51
13.	Ensayo de reconocimiento de la hGH.	52



## LISTA DE TABLAS

Número	Título	Página
1.	Complicaciones del gigantismo y acromegalia desglosadas por sistemas.	18
2.	Comparación entre los sdAbs de origen humano, camélido y peces cartilaginosos.	28
3.	Etapas de desarrollo de algunos sdAbs cuya patente pertenece a la empresa Ablynx.	29
4.	Protocolo de inmunización.	38
5.	Luminiscencia emitida por las clonas obtenidas a partir de la biblioteca nativa.	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
hGH	Hormona de crecimiento humana
CSH	Somatomamotropina coriónica
GHRH	Hormona liberadora de hormona de crecimiento
GHR	Receptor de la hormona de crecimiento
G <sub>s</sub>	Proteína G estimulante
G <sub>i</sub>	Proteína G inhibidora
JAK2	Cinasa Janus 2
STAT5	Transductor de señal y activador de la transcripción 5
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
hGHBP	Proteína transportadora de hormona de crecimiento
GTP	Trifostato de guanosina
SAOS	Síndrome de apnea obstructiva del sueño
EVC	Evento vascular cerebral
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
cm	Centímetro
bGH	Hormona de crecimiento bovina
H	Cadena pesada
L	Cadena ligera
Fab	Fragmento de unión a antígeno
Fc	Fragmento cristalizante
Fv	Fragmento variable
CH <sub>1</sub>	Dominio constante 1
CL	Dominio constante de la cadena ligera

Fw	Región en marco
CDR	Región determinante de complementariedad
CDR1	Región determinante de complementariedad 1
CDR2	Región determinante de complementariedad 2
CDR3	Región determinante de complementariedad 3
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
HcAb	Anticuerpo de cadenas pesadas
MAb	Anticuerpo monoclonal
CD3	Cúmulo de diferenciación 3
GP1Ib/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
kDa	Kilodaltones
VH	Dominio variable de las cadenas pesadas
VL	Dominio variable de las cadenas ligeras
VHH	Dominio variable de los anticuerpos de camélidos
VNAR	Nuevo receptor de antígeno variable
Gly	Glicina
Ser	Serina
scFv	Fracción variable de cadena sencilla
dsFv	Fv estabilizada por disulfuro
sdAb	Anticuerpo de dominio único
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
vWF	Factor de Von Willebrand
IL-17F-IL17A	Interleucina 17F-Interleucina 17A

RANKL	Ligando del receptor activador para el factor nuclear $\kappa$ - $\beta$
RSV	Virus sincicial respiratorio
CXCR2	Receptor de la interleucina 8- $\beta$
IL-6R	Receptor de la interleucina 6
ADNc	ADN complementario
ARNm	ARN mensajero
pV	Proteína V
mL	Mililitro
$\mu$ L	Microlitro
LIMB	Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas
CICESE	Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Retrotranscripción-PCR
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
BSA	Albúmina sérica bovina
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
HRP	Peroxidasa de rábano

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. Introducción.....	15
1.1 Locus de la hormona de crecimiento humana.....	15
1.2 Síntesis y regulación.....	15
1.3 Mecanismo de acción.....	16
1.4 Enfermedades asociadas a la hGH.....	17
1.5 Terapias actuales.....	19
1.6 Anticuerpos.....	23
1.6.1 Anticuerpos como opciones terapéuticas.....	24
1.6.2 Fragmentos de anticuerpos.....	26
1.6.3 Anticuerpos de dominio único.....	27
1.6.4 Tecnologías para el desarrollo de anticuerpos.....	29
1.6.4.1 Despliegue de fagos.....	29
1.6.4.1.1 Bibliotecas de anticuerpos.....	30
1.6.4.2 Despliegue de células.....	32
2. Justificación.....	33
3. Objetivo general.....	34
3.1 Objetivos particulares.....	34
4. Estrategia general.....	35
5. Materiales y métodos.....	35
5.1 Materiales.....	35
5.2 Reactivos.....	35
5.3 Metodología.....	36
5.3.1 Inmunización de un tiburón de la especie <i>Heterodontus francisci</i> (CISESE).....	37
5.3.2 Construcción de una biblioteca de bacteriófagos portadores de VNARs (CICESE).....	37
5.3.3 Selección de VNARs candidatos con mayor afinidad hacia la hGH.....	39
5.3.4 Tamizaje de una biblioteca nativa (UANL).....	40
5.3.5 Producción en el laboratorio de VNARs candidatos (UANL).....	41
5.3.6 Evaluación de capacidad de reconocimiento de VNARs hacia la hGH (UANL).....	41
6. Resultados.....	42
6.1 Inmunización de un tiburón de la especie <i>Heterodontus francisci</i> .....	42
6.2 Construcción de una biblioteca de bacteriófagos portadores de VNARs.....	42
6.2.1 Extracción de ARNm.....	42
6.2.2 Conversión a ADNc mediante RT-PCR.....	43

6.2.3 Ligación y transformación de <i>E. coli</i> ER2537.....	44
6.3 Seleccionar los VNARs candidatos con mayor afinidad hacia la hGH.....	45
6.3.1 Monitoreo de las rondas de selección.....	45
6.3.1.1 Índice output/input.....	45
6.3.1.2 ELISA de fagos.....	46
6.3.2 Selección de las clonas.....	47
6.3.3 Tamizaje de una biblioteca nativa.....	47
6.3.3.1 Selección de las clonas por secuenciación.....	49
6.3.3.2 Selección de las clonas por producción.....	49
6.4 Producción de los VNARs candidatos en el laboratorio.....	51
6.5 Evaluación de la capacidad de reconocimiento de la hGH.....	51
7. Discusión.....	53
8. Conclusiones.....	54
9. Perspectivas.....	55
10. Bibliografía.....	56

## 1. Introducción

### 1.1 Locus de la hormona de crecimiento humana

El gen responsable de la síntesis de la hormona de crecimiento humana (hGH), referido como *hGH-1* o *hGH-N*, se localiza en la banda 24.2 del cromosoma 17 [1]. Este locus del genoma humano incluye otros cuatro genes relacionados [2], que se ha postulado surgieron por duplicaciones génicas. Uno de esos genes codifica para una variante de la hGH que se le conoce como *hGH-2* (o *hGH-V*); otros dos, llamados *CSH-1* (*CSH-A*) y *CSH-2* (*CSH-B*), que codifican para el lactógeno placentario o también denominado somatomamotropina coriónica (*CSH*). Cabe recalcar que el producto maduro de ambos genes es idéntico [3]. El gen restante, el pseudogen *CSH-L*, posee una mutación que interfiere con la remoción de su segundo intrón. Todos estos otros genes se expresan en la placenta.

### 1.2 Síntesis y regulación

La hGH es secretada principalmente por la glándula pituitaria y fomenta el crecimiento lineal de nuestro cuerpo. Manifiesta dos picos de secreción, uno en el primer año de vida y el otro en la pubertad; tras este último, sus niveles disminuyen gradualmente.

La secreción de la hGH es pulsátil y es regulada por el hipotálamo a través de la somatostatina y la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH). La

primera inhibe su secreción y la segunda promueve su liberación. Los receptores de ambas son receptores ligados a proteínas G, sin embargo el receptor de GHRH es de tipo  $G_s$  a diferencia del receptor de somatostatina, que es de tipo  $G_i$  [4].

La hGH participa también, aunque en menor medida, en el metabolismo energético, por lo que su secreción también se encuentra regulada por los niveles de ácidos grasos libres y glucosa en sangre. Al disminuir los niveles de estos la secreción de GHRH aumenta y subsecuentemente aumenta la de la hGH teniendo como efecto final el aumento de la glucosa y de los ácidos grasos en sangre. Por otro lado, su secreción disminuye con la ingesta de carbohidratos y aumenta con la de aminoácidos esenciales [5].

### **1.3 Mecanismo de acción**

Para ejercer su efecto la hGH debe unirse a su receptor (GHR), una proteína transmembranal perteneciente a la familia de los receptores de citocinas tipo I. Al unírsele la hormona, provoca su dimerización y enseguida la activación de la vía de JAK2-STAT5 promoviendo el crecimiento y la supervivencia celular [6]. La interacción entre hGH y GHR se da en dos sitios diferentes denominados sitio 1 y 2.

El principal órgano blanco de la hGH es el hígado, donde induce la expresión del gen IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina), el principal responsable de los efectos de la hGH sobre el organismo [7].



El gen del GHR, gracias a un corte y empalme alternativo de su ARN mensajero (RNAm), da origen también a la proteína de unión a la hGH (hGHBP), que es la encargada de transportarla en el plasma [8].

#### **1.4 Enfermedades asociadas a la hGH**

La sobreproducción de hGH se ha relacionado con dos padecimientos importantes: acromegalia y gigantismo. Su incidencia es de 40-70 y 3-4 individuos por cada millón de habitantes respectivamente, siendo la edad media de aparición la tercera década de la vida [9].

Más del 95% de los casos de acromegalia y gigantismo son causados por adenomas hipofisarios. Otras causas menos frecuentes son la neoplasia endocrina múltiple, síndrome de McCune–Albright, neurofibromatosis, secreción ectópica de hGH o GHRH por tumores malignos, esclerosis tuberosa y el complejo de Carney [10-16].

Alrededor del 40% de los tumores secretores de hGH poseen una mutación en el gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína estimuladora heterodinámica de unión a GTP. Esta mutación genera una activación continua de la adenilciclase, lo que promueve la expresión del gen HGH-N y la secreción de hGH [17].

Debido a la amplia gama de efectos y tejidos blanco que tiene el eje hGH/IGF-1 en el organismo, estos dos padecimientos presentan un gran número de complicaciones afectando a varios sistemas, éstas se exponen en la tabla 1 [18-25]:

**Tabla 1.** Complicaciones del gigantismo y acromegalia desglosadas por sistemas.

Cardiovascular	Musculoesquelético	Tegumentos	Sistema nervioso	Sistema urinario	Metabolismo	Otros
Corazón acromegálico	Aumento en la masa muscular	Adelgazamiento de la piel	Aneurisma cerebral/EVC	Urolitiasis	Diabetes	Cáncer
Hipertrofia ventricular	Lumbalgia		Compresión nerviosa			SAOS
Hipertensión arterial	Cifosis		Radikulopatías			Fatiga
	Debilidad muscular					Organomegalias

SAOS= Síndrome de apnea obstructiva del sueño; EVC= Evento vascular cerebral.

Se ha demostrado un incremento en la mortalidad de los pacientes con acromegalia de aproximadamente 2.5 veces, lo cual se revierte con la normalización de los niveles de hGH e IGF-1 [26].

Con respecto al cáncer, recientemente se ha estudiado la producción local de hGH y la expresión de su receptor en ciertos tipos de neoplasias. Entre las neoplasias más estudiadas se encuentra el cáncer de mama, para lo que se ha documentado expresión de hGH y GHR mayores que en tejido sano.

En experimentos de xenotrasplantes de células tumorales a ratones desnudos tratados con un inhibidor comercial del GHR, se vio una disminución importante en el crecimiento tumoral en comparación con los ratones no tratados. También existe evidencia que sugiere que la producción local de hGH es inducida por progesterona y que el 72% de los carcinomas ductales son positivos para el GHR [27].

En cáncer de colon, se ha relacionado la expresión de GHR con el potencial metastásico. De hecho se encontró que la inhibición del GHR con un ARN de interferencia (ARNi) disminuía de manera importante el tamaño de tumores

derivados de células de cáncer de colon con un efecto comparable al obtenido con 5-fluorouracilo [28]. Asimismo, un estudio *in vitro* demostró que la inhibición del GHR con un ARNi disminuía de manera importante la capacidad proliferativa y potencial metastásico en las líneas celulares HPAC y PANC-1 de cáncer pancreático [29].

Mientras que para el caso de lesiones metastásicas del melanoma, se ha visto un aumento en la proliferación mediado por hGH y en la expresión de GHR [30]. Asimismo, se ha detectado la presencia de GHR en biopsias de craneofaringiomas y se evidenció que al estimular *in vitro* a las células de estos tumores con hGH, se induce su proliferación [31]. En tanto que en el cáncer prostático, se ha detectado secreción de hGH en algunas líneas celulares derivadas, por lo cual se sugiere que existe secreción local de la hGH [32].

### **1.5 Terapias actuales**

El tratamiento de primera línea de la acromegalia es la resección quirúrgica transesfenoidal de la glándula pituitaria [99]. Las complicaciones de la cirugía incluyen sangrado, derrame de líquido cefalorraquídeo, meningitis, desbalance hidroelectrolítico e hipopituitarismo [93-95]. El éxito de la misma cirugía está ligado a la experiencia del cirujano y al tamaño de los adenomas, consiguiendo una remisión completa en alrededor del 85% cuando se trata de microadenomas (tumores con diámetro menor a 1 cm) y entre 40-50% cuando se trata de macroadenomas (tumores con diámetro mayor o igual a 1 cm) [93, 96, 97].

La recurrencia de la enfermedad en los pacientes a los cuales se les practica un abordaje quirúrgico oscila entre un 2-8% [93, 97, 98].

Los pacientes que no hayan conseguido una remisión completa de la enfermedad, o bien, no hayan sido candidatos a un abordaje quirúrgico, tendrán que recibir tratamiento farmacológico de por vida.

Para el tratamiento de estos padecimientos se cuenta con tres tipos de medicamentos, los análogos de la somatostatina, un antagonista del GHR (pegvisomant) y los agonistas de la dopamina [33]. Los análogos de la somatostatina utilizados son el octreótido y el lanreótido. La efectividad de los análogos de la somatostatina oscila entre 17-35% [34-37]. Los efectos adversos que ocurren con mayor frecuencia son dolor abdominal, flatulencias y diarrea; además de que en aproximadamente 25% de los pacientes se ha visto el desarrollo de colecistolitiasis [38].

Por su parte, el pegvisomant es actualmente el único antagonista del GHR disponible en el mercado. Este medicamento es la versión pegilada de la molécula B2036, la cual es una mutante de la hGH con aumento en la afinidad por el GHR, además de una mutación que nulifica su actividad biológica [39]. El pegvisomant actúa directamente en el hígado inhibiendo la secreción de IGF-1 [40].

La mutación G120K es la responsable de nulificar sus efectos biológicos. Este residuo se encuentra en el sitio 2 y su importancia para los efectos biológicos de hGH fue planteada debido a que un estudio en ratones transgénicos, que

expresaban la mutante G119A de la GH bovina (bGH) presentaban una importante supresión de su crecimiento [41], y posteriormente se demostró que se obtenía un efecto similar con la mutación G120R llegando a la conclusión de que la glicina 120 es crucial para la actividad de la hGH [42].

Para el incremento en la afinidad por el GHR se realizaron mutaciones en residuos aminoacídicos presentes en el sitio 1, las cuales se había demostrado previamente que eran capaces de incrementar la afinidad de la hGH por la forma soluble de su receptor (hGHBP) [43] y existe evidencia de que este incremento en afinidad por el GHR puede favorecer la capacidad inhibitoria de la molécula [44].

Las mutaciones presentes en el sitio 1 de esta molécula son H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S y I179T, las cuales incrementan la afinidad por la hGHBP en alrededor de cinco veces [45, 46]. Sin embargo, no parecen ejercer efecto sobre la afinidad hacia el GHR [45].

En cuanto a la efectividad del pegvisomant, un estudio en 1288 pacientes encontró que sólo el 63% de los pacientes tratados con pegvisomant normalizó sus niveles de IGF-1 [47].

Los principales efectos adversos del pegvisomant son el incremento en el tamaño del adenoma hipofisario, además de un incremento en las enzimas hepáticas. Se ha reportado que entre un 3-5% de los pacientes tratados con pegvisomant presentan un aumento de tamaño de su adenoma hipofisario y se

propone que esto es debido a la falta de retroalimentación negativa por parte de IGF-1 [48, 49].

En lo que respecta a las enzimas hepáticas, un grupo de investigadores reportó un incremento de éstas en alrededor del 9% de los pacientes tratados con pegvisomant, por lo que los expertos recomiendan un monitoreo periódico de la función hepática [50].

El uso de los agonistas de la dopamina, como la carbegolina, es recomendado únicamente cuando los pacientes presentan una modesta elevación de los niveles de IGF-1 y hGH [51]. La normalización de los niveles de hGH e IGF-1 se consigue aproximadamente en el 30% de los pacientes [52]. Sin embargo esta eficacia se ve disminuida con el paso del tiempo [53].

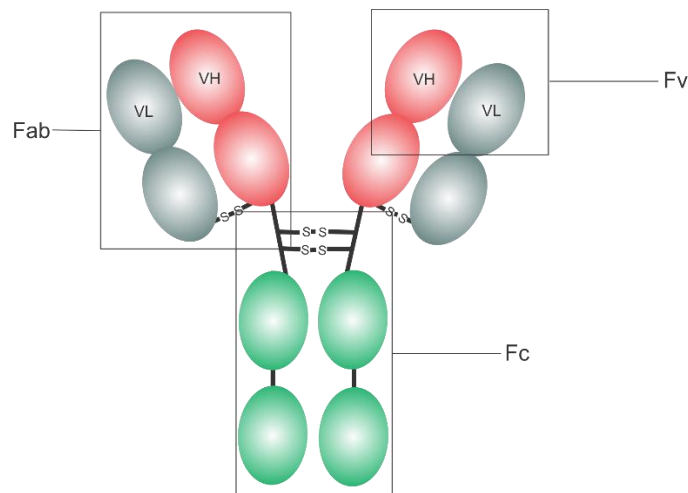
La combinación de los análogos de la somatostatina y el pegvisomant ha demostrado ser la terapia más eficaz, normalizando los niveles de IGF-1 hasta en un 95% de los pacientes. Desafortunadamente 27% de los pacientes tratados desarrollaban una elevación en las transaminasas [54].

También se ha medido el efecto que tiene el adicionar pegvisomant a la terapia de pacientes que son tratados con carbegolina, siendo el resultado un incremento en el porcentaje de pacientes en los cuales se alcanzó una normalización de IGF-1 de un 11% a un 68%, lo cual disminuía a 28% al suspender la carbegolina [55].

Por último, la combinación de carbegolina con los análogos de la somatostatina logra un control de la enfermedad en un 42-60% de los pacientes [52, 56].

## 1.6 Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas producidas por el sistema inmune de los vertebrados encargadas de neutralizar elementos extraños al organismo. La estructura de los anticuerpos de la mayoría de los vertebrados consta de dos cadenas pesadas (H) iguales y dos cadenas ligeras (L) idénticas, unidas mediante enlaces disulfuro (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura básica de un anticuerpo. Las cadenas que se muestran lateralmente corresponden a las cadenas ligeras y las centrales a las cadenas pesadas. Fab: fragmento de unión a antígeno; Fv: fragmento variable; Fc: fragmento cristalizante.

La conformación resultante de la unión de las cadenas posee tres unidades estructurales; dos de éstas son idénticas y se encargan de la unión del antígeno.

A estas subunidades se les conoce como fragmento de unión a antígeno (Fab); la tercera unidad, el fragmento cristalizante (Fc), se encarga de la interacción con los sistemas efectores (complemento, fagocitos, eosinófilos). A su vez, podemos dividir al Fab en una porción constante y un fragmento variable (Fv). La porción constante está conformada el dominio constante 1 de las cadenas pesadas (CH<sub>1</sub>) y el dominio constante de la cadena ligera (CL), mientras que la Fv está

conformada por el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el de la cadena ligera (VL). Estos dominios variables poseen a su vez segmentos constantes denominados regiones en marco (Fw del inglés *framework*) y segmentos de gran variabilidad conocidos como regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDRs), estas últimas son las responsables de la unión al antígeno y su secuencia aminoacídica es distinta entre cada anticuerpo. Los anticuerpos poseen tres CDRs denominadas CDR1, CDR2 y CDR3. De éstas, destaca la CDR3 que es la de mayor grado de variabilidad entre cada anticuerpo y a la que se le atribuye en mayor medida la unión al antígeno.

Existen cinco clases de anticuerpos, llamadas inmunoglobulinas G (IgG), inmunoglobulinas M (IgM), inmunoglobulinas D (IgD), inmunoglobulinas E (IgE) e inmunoglobulinas A (IgA). Estas clases se diferencian entre sí al poseer cada una distintas cadenas H, las cuales son llamadas  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\alpha$ , respectivamente. Estas diferencias les confieren distinta función efectora a cada una de las diferentes clases.

Algunas especies producen anticuerpos formados únicamente por cadenas pesadas (HcAbs) como en los casos de los camélidos y los peces cartilaginosos. Este tipo de anticuerpos ha sido de interés para el desarrollo de métodos diagnóstico y terapias debido a las bondades de sus dominios variables [57-59].

### **1.6.1 Anticuerpos como opciones terapéuticas**

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) son una mezcla de anticuerpos idénticos entre sí que son producidos por una sola clona de linfocitos B. George Köhler y



Cesar Milstein fueron los primeros en describir una técnica para su producción en 1975. Esta técnica consistía en la inmortalización de un linfocito B al fusionarlo con una célula de mieloma múltiple. A las células derivadas de esta fusión se les conoce como hibridomas [60].

En 1986 se aprobó el primer MAb para uso terapéutico llamado OKT3. Éste era de origen murino y estaba dirigido contra CD3. Se utilizó para tratar el rechazo a trasplantes, sin embargo debido a la aparición de anticuerpos anti-murino la respuesta no fue la deseada [61].

Para resolver este problema, mediante ingeniería genética se crearon anticuerpos quiméricos con la Fv de anticuerpos de ratón y la Fc de los anticuerpos humanos [62]. Pero no fue hasta 1994 que se aprobara el primer anticuerpo quimérico llamado ReoPro, el cual iba dirigido contra la glicoproteína GPIIb/IIIa, siendo su aplicación en problemas cardíacos [63].

Desafortunadamente, a pesar de obtener mejores resultados con estos anticuerpos, algunos pacientes desarrollaban anticuerpos contra ellos [64].

Para minimizar aún más la probabilidad de desarrollar una respuesta inmune, mediante ingeniería de proteínas se modificaron los anticuerpos humanos para sustituir sus CDRs por las presentes en anticuerpos de origen murino, los cuales se dirigían hacia el blanco deseado [65].

La desventaja de este último método es que la afinidad por el antígeno en muchas ocasiones no es la misma que la del anticuerpo murino original. Esto llevó a la necesidad de desarrollar anticuerpos humanos, sin embargo no es

factible la inmunización de humanos con ciertos antígenos para la construcción de un hibridoma, por lo que se recurrió a la técnica de despliegue de fagos para la selección de anticuerpos con capacidad de unión al ligando deseado [61].

### **1.6.2 Fragmentos de anticuerpos**

El peso molecular de un anticuerpo es aproximadamente de 150 kDa y ello impide que difunda de manera adecuada a ciertos tejidos como lo serían tumores sólidos. Debido a lo anterior, se han clonado casetes de expresión en diversos sistemas que codifican para fragmentos de anticuerpos, de esta manera se obtienen anticuerpos con una vida media más corta y capaces de penetrar con mayor facilidad los tejidos, lo que los hace mejores para ciertas aplicaciones como en el área de oncología y hematología, además de que de esta manera se pueden utilizar sistemas de expresión bacterianos que facilitan su producción biotecnológica [61].

Para conservar su capacidad de unión a un antígeno, los anticuerpos generados deben conservar por lo menos su dominio variable. Se ha logrado expresar desde la región Fab de los anticuerpos hasta un único dominio de éstos, ya sea proveniente de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL), de los anticuerpos de camélidos (VHH) o de peces cartilaginosos (VNAR).

También se han expresado los VH y VL como una única cadena polipeptídica unida por un péptido flexible, siendo el más utilizado el (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. Todo esto para estabilizar su unión (Fv de cadena sencilla o scFv) [66]. Además, otra forma

de unir estos dominios variables es a través de un enlace disulfuro (Fv estabilizada por disulfuro o dsFv) [67].

Otra alternativa es crear homodímeros de scFvs al unir los dominios variables con un péptido corto de alrededor de cuatro aminoácidos que los fuerza a adoptar su conformación dimérica. Éstos son conocidos como “diabodies” [68].

Los dsFvs pueden ser producidos de forma dimérica (dsFv)<sub>2</sub> al expresar en tándem dos dsFv separados por una secuencia de aminoácidos flexible [69]. Existen además anticuerpos que constan de homodímeros de una proteína fusión entre un scFv y un dominio CH3, conocidos como “minibodies”. Así como una variante en donde se añade una secuencia flexible entre el scFv y el dominio CH3, conocidos como “Flex minibody” [70]. Éstas dos últimas formas de anticuerpos aparentemente no muestran disminución en la afinidad hacia su ligando y poseen un tiempo de vida corto [71].

### **1.6.3 Anticuerpos de dominio único**

Los anticuerpos de dominio único (sdAbs) han adquirido recientemente mucho interés en el área de la biomedicina. Son producto de la clonación y expresión del dominio variable de una única cadena de anticuerpo, pudiendo provenir de las cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos humanos (VH o VL respectivamente), o bien, de los HcAbs, VHHs y VNARs [72].

Desde la década de 1980 los VH y los VL fueron propuestos como moléculas que serían de gran utilidad como herramientas diagnósticas y terapéuticas, debido a que son los dominios responsables de la unión hacia un antígeno.

Desafortunadamente se presentaron algunas dificultades para su producción biotecnológica debido a la tendencia a la agregación de estas moléculas [73].

El descubrimiento de los HcAbs hizo más factible la posibilidad de producir estos anticuerpos para los intereses de la industria biomédica. Éstos fueron identificados inicialmente en camélidos al constatar que carecían de cadenas pesadas [57]. Se propuso y posteriormente se comprobó su mayor solubilidad y resistencia a la agregación [74], característica que también comparten los VNARs de por ejemplo tiburón [72]. En la tabla 2 se resumen las ventajas y desventajas de los tipos de sdAbs.

**Tabla 2.** Comparación entre los sdAbs de origen humano, camélido y peces cartilaginosos.

Tipo de anticuerpo	VH	VL	VHH	VNAR
<b>Fuente</b>	Humana Sintética Ratones transgénicos	Nativa Sintética	Camélidos (inmune y no inmune) Sintética Semisintética	Peces cartilaginosos (inmune y no inmune) Nativa Sintética Semisintética
<b>Características</b>	Baja solubilidad Tendencia a agregar Baja expresión	Moderada solubilidad Tendencia a agregar Moderada expresión	Alta solubilidad Sin tendencia a agregar Alta expresión	Alta solubilidad Sin tendencia a agregar Alta expresión

Actualmente los sdAbs están siendo investigados como potenciales herramientas diagnósticas y terapéuticas. Entre algunas de las proteínas que son blanco de estas moléculas se encuentran la proteína NS1 del virus del dengue tipo 2 [75], el factor activador de células B [76], interleucina-1, TNF- $\alpha$ , VEGF [77], células endoteliales de la microvasculatura cerebral [78], factor de Von Willebrand [79] y la hGH fusionada a la proteína verde fluorescente superenrollada [80], entre otros.

La empresa Ablynx es una de las líderes en el desarrollo de sdAbs para fines terapéuticos y actualmente cuenta con las patentes de varios que se encuentran ya en fases de investigación clínica. En la tabla 3 se muestran algunas de estas moléculas y la fase de investigación en la que se encuentran.

**Tabla 3.** Etapas de desarrollo de algunos sdAbs cuya patente pertenece a la empresa Ablynx.

Área terapéutica	Nombre	Objetivo	Desarrollo	Pre-clínico	Fase-I	Fase-II	Fase-III
Hematología	caplacizumab	vWF					
Inmunología/Infectología	ozoralizumab	TNF- $\alpha$					
	ALX-0061	IL-6R					
	ALX-0761	IL-17F-IL17A					
Oncología	Diversos	Diversos					
Afecciones óseas	ALX-0141	RANKL					
Neumología	ALX-0171	RSV					
Ofthalmología	En investigación	VEGF					
Neurología	En investigación	Confidencial					
Otros	En Investigación	CXCR2					

vWF: factor de Von Willebrand; IL-6R: receptor de la interleucina 6; IL-17F-IL17A: interleucina 17F-interleucina 17A; RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ - $\beta$ ; RSV: virus sincial respiratorio; VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular; CXCR2: receptor de la interleucina 8- $\beta$ . Datos obtenidos de su página de internet [www.ablynx.com](http://www.ablynx.com).

#### 1.6.4 Tecnologías para el desarrollo de anticuerpos

##### 1.6.4.1 Despliegue de fagos

La tecnología de despliegue de fagos consiste en la expresión de un péptido, ya sea una proteína completa o únicamente un dominio de ésta, en la superficie de un bacteriófago, para después confrontarla con otro péptido de interés. Esta tecnología es utilizada principalmente para estudiar las interacciones proteína-ligando y para el desarrollo de anticuerpos.

Para el desarrollo de anticuerpos utilizando esta tecnología se requiere de la construcción de una biblioteca de anticuerpos. Mediante la clonación del ADN

complementario (ADNc) al ARNm que codifica para los Fabs, Fvs o dominios variables de los anticuerpos en un vector fagémido. Éste permite expresar el anticuerpo fusionado a una proteína estructural de un bacteriófago además de poseer el origen F1, que es una secuencia reconocida por la proteína pV y que le facilita su empaquetamiento en el bacteriófago.

Una vez obtenida esa construcción, una cepa de *E. coli* es transformada con este vector y posteriormente infectada con un bacteriófago cooperador. Éste posee un gen de resistencia a antibiótico y una mutación en el origen F1 que disminuye las probabilidades de empaquetamiento en el bacteriófago. Esto permite la expresión de las proteínas estructurales restantes del bacteriófago y el empaquetamiento del ADN del fagémido en la capsida del bacteriófago.

Posteriormente se confrontan los bacteriófagos con el antígeno blanco, unido por ejemplo al fondo de una placa de plástico de las que se usan para hacer microtitulaciones. Enseguida se lavan los bacteriófagos no unidos y luego se eluyen los bacteriófagos adheridos, para reinfectar con estos a *E. coli* y repetir este ciclo de manera seriada. Al final los anticuerpos obtenidos se caracterizan y se expresan para corroborar su capacidad de reconocimiento y medir su afinidad por el ligando [81].

#### **1.4.1.1 Bibliotecas de anticuerpos**

Las bibliotecas pueden ser inmunes, nativas, sintéticas y semi-sintéticas. Las bibliotecas inmunes son construidas a partir de individuos o animales expuestos previamente al antígeno deseado. Ofrecen la ventaja de que aumentan las

probabilidades de obtener anticuerpos específicos con alta afinidad hacia el ligando.

Las bibliotecas nativas provienen de individuos o animales a los cuales no se les administró indujo una respuesta inmune contra el antígeno deseado. Éstas suelen requerir de técnicas de evolución *in vitro* y usualmente de bibliotecas de muy alta complejidad (número de fagos recombinantes diferentes) para obtener anticuerpos con alta afinidad.

Las bibliotecas sintéticas son de gran utilidad cuando la proteína blanco es un antígeno propio. Para generarlas se parte de una biblioteca nativa y utilizando técnicas de biología molecular para que, mediante recombinación homóloga de los genes que codifican para las regiones variables de los anticuerpos, se aumente la complejidad de ésta y se incrementen de manera importante las probabilidades de obtener anticuerpos contra esta clase de antígenos [82].

Debido a que la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos hacia un antígeno está dada por sus CDRs, las bibliotecas semi-sintéticas se basan en la mutación de las regiones CDRs de los dominios variables de los anticuerpos, dejando intactas sus regiones en marco. Al principio éstas fueron utilizadas para mejorar la afinidad de algunos anticuerpos aislados los cuales no tenían la afinidad deseada [83]. Sin embargo, actualmente se utilizan para tener bibliotecas con gran diversidad que permiten el aislamiento de anticuerpos para diversos fines [84].

#### **1.6.4.2 Despliegue de células**

Los anticuerpos además de ser desplegados en bacteriófagos, pueden ser también desplegados en la superficie de las células microbianas como bacterias o levaduras [85-89]. Para esto se hace una fusión del anticuerpo con una proteína de superficie de la célula utilizada, se confrontan contra un antígeno marcado con un fluorocromo para finalmente seleccionarlos mediante citometría de flujo [90].



## 2. Justificación

Tradicionalmente la hGH se ha relacionado con diversas patologías con importantes repercusiones clínicas. Sin embargo, recientemente han surgido nuevos descubrimientos que la han asociado con patologías en las cuales esta hormona pudiera estar jugando un importante papel fisiopatogénico, tales como el cáncer.

El contar con un sdAb contra la hGH podrá ser útil para el tratamiento de las enfermedades asociadas a ésta; además de en su diagnóstico e investigación.

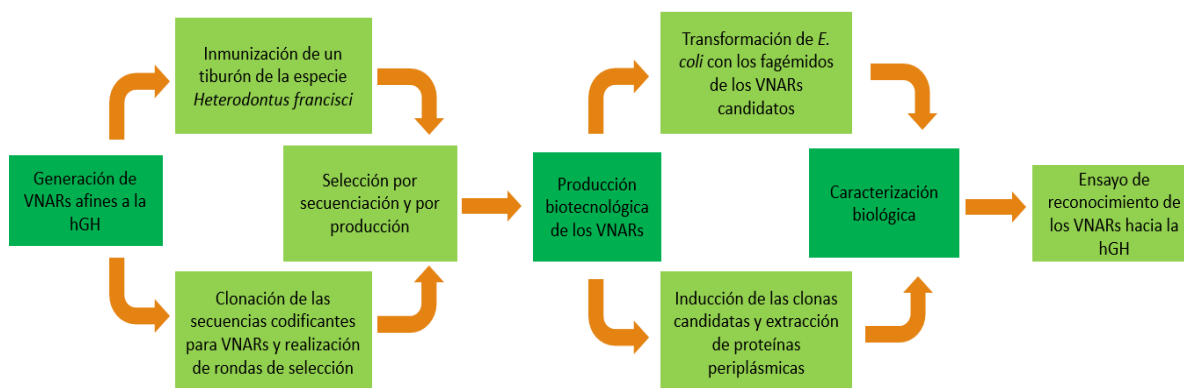
### 3. Objetivo general:

Producir VNARs contra la hormona de crecimiento humana

#### 3.1 Objetivos particulares:

- 1) Inmunización de un tiburón de la especie *Heterodontus francisci*.
- 2) Construcción de una biblioteca de bacteriófagos portadores de VNARs.
- 3) Selección de los VNARs candidatos con mayor afinidad hacia la hGH.
- 4) Producción en el laboratorio los VNARs candidatos.
- 5) Evaluación de su capacidad de reconocimiento de la hGH.

## 4. Estrategia general



**Figura 2.** Estrategia general para el desarrollo de los VNARs anti-hGH.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Materiales

Tubos Eppendorf (0.2 mL, 0.5 mL, 1.5 mL y 2 mL)(CTR), tubos Falcon de 15 mL y 50 mL (CTR), placas de ELISA de 96 pozos (Uniparts), Placas de ELISA de 96 pozos para luminiscencia (Costar), puntas para micropipeta blancas, amarillas y azules (Uniparts), puntas con filtro (10 µL, 200 µL y 1 mL) (CTR), pipetas 10mL, 25 mL y 50 mL (CTR), placas de Petri (Uniparts), jeringas de plástico (3 mL, 5 mL y 10 mL)(CTR), bisturíes de acero (CTR), cubetas de electroporación (Bio-rad), papel aluminio (CTR).

### 5.2 Reactivos

Adyuvante de Freund (Sigma-Aldrich), hGH comercial (Genotropin, Pfizer), PBS, PBS con 3 % BSA, PBS con 1 % BSA, cloroformo (Sigma-Aldrich), etanol 100 % (Sigma-Aldrich), etanol 70%, isopropanol (Sigma-Aldrich), metanol 100 %

(Sigma-Aldrich), acetato de amonio [Control Técnico y Representaciones, SA de CV (CTR), Monterrey, N. L., México], acetato de sodio (CTR), cloruro de sodio (CTR), glucosa (CTR), cloruro de magnesio (CTR), agar (CTR), cloruro de potasio (CTR), Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich), Ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich), dióxido de carbono (CTR), sulfato de magnesio (Sigma-Aldrich), cloruro de calcio (CTR), fosfato diácido de sodio (Sigma-Aldrich), bicarbonato de sodio (CTR), imidazol (Sigma-Aldrich), glicina (Bio-rad), dodecilsulfato sódico (Bio-rad), bromuro de etidio (Sigma-Aldrich), ampicilina (Affymetrix), glicógeno (Sigma-Aldrich), carbenicilina (Invitrogen), kanamicina (Invitrogen), tris base (Bio-rad), tween 20 (Sigma-Aldrich), leche descremada (Sigma-aldrich), glicerol (CTR), IPTG (Sigma-Aldrich), acrilamida (Bio-rad), TEMED (Bio-rad), persulfato de amonio (Sigma-Adrich), polietilen glicol 8000 (Probiotek), triptona (Invitrogen), extracto de levadura (Invitrogen), agarosa (CTR), Tripsina (Invitrogen), Master mix para Gotaq (Uniparts), trizol reagent (Sigma-Aldrich), kit de retrotranscripción (SuperScript III)(Uniparts), kit de ligación T4 DNA ligasa (Uniparts), RNAsa, Gotaq polimerasa (Uniparts), enzima de restricción *Sfi*I (CTR), anticuerpo de ratón anti-His (Abcam), anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con PE, amortiguador de digestión 4(CTR), agua miliQ y DEPC (CTR), cepas de E. coli ER2537, BL21, fago helper M13K07 (CTR).

### **5.3 Metodología**

El presente estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Biotecnología y de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina

Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, así como en el Departamento de Biología Experimental y Aplicada del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California Norte, que dirige el Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro.

### **5.3.1 Inmunización de un tiburón de la especie *Heterodontus francisci* (CICESE)**

Se inmunizaron dos tiburones de la especie *Heterodontus francisci*, los cuales fueron provistos por el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas (LIMB) del CICESE. En la tabla 4 se describe el protocolo de inmunización de los animales. En cada inmunización se inocularon 50 µg de hGH junto con adyuvante de Freund, en la primera inmunización se utilizó el adyuvante completo y en las subsecuentes adyuvante incompleto. Se realizaron sangrados previos a cada inmunización y el plasma de estos fue utilizado para evaluar la respuesta del tiburón al antígeno administrado, por medio de ELISA.

### **5.3.2 Construcción de una biblioteca de bacteriófagos portadores de VNARs (CICESE)**

Después del sacrificio del tiburón, se extrajo el ARNm de los linfocitos B del tiburón. Posteriormente se hizo una conversión a ADNc y amplificación de las secuencias codificantes para los VNARs mediante RT-PCR utilizando primers diseñados por el laboratorio de Dr. Licea para su amplificación. Estos primers tienen adicionado un sitio de corte para la enzima *SfiI*, que permite la inserción

de los amplicones al vector fagémido pComb3X, el cual posee los mismos sitios de corte.

**Tabla 4.** Protocolo de inmunización.

FECHA	SANGRADO	INMUNIZADO
11-Jul-14	X (PRE INMUNE)	c/adyuvante completo
1-Ago-14	X	c/adyuvante incompleto
29-Sep-14	X	c/adyuvante incompleto
10-Oct-14	X	c/adyuvante incompleto
24-Oct-14	X	c/adyuvante incompleto
31-Oct-14	Sacrificio del Tiburón	

Una vez clonadas las secuencias VNAR dentro del pCom3X, se procedió a transformar con este vector la cepa de *E. coli* ER2537. Ésta es una cepa SupE, la cual reconoce el codón de terminación TGA (presente en el vector) como codificante para ácido glutámico en lugar de para una señal de terminación de la traducción, lo que permite expresar la proteína de interés (VNAR) como una fusión con la proteína de cubierta del fago (pIII) y de esta manera expresarla en la superficie de la partícula viral.

Se realizó una ligación y transformación a pequeña escala inicialmente, esto con el fin de saber el número de transformaciones necesarias para obtener una biblioteca con una complejidad suficiente para llevar a cabo las rondas de selección. Para ésta, se realiza solamente una reacción de ligación y se transforma con todo el material obtenido, se cuentan el número de transformantes obtenidas y con ese número se calcula el número de ligaciones necesarias para obtener una biblioteca con una complejidad de por lo menos

$5 \times 10^7$ . Posteriormente, se realizaron el número de ligaciones y transformaciones necesarias para alcanzar esta complejidad (ligación a gran escala).

### **5.3.3 Selección de VNARs candidatos con mayor afinidad hacia la hGH**

Una vez transformada la cepa de *E.coli* en cuestión, se generaron partículas virales completas al infectarlas con fago cooperador M13K07, el cual permite ensamblar el fago final, ya que carga en su genoma las secuencias para la expresión de las proteínas estructurales restantes del virus en el pComb3X.

Las partículas virales fueron liberadas al medio por las células infectadas, se procedió a su cosecha, precipitación y concentración para incubarlas con la hGH, la cual fue previamente adsorbida en una placa de ELISA de 96-pozos. Después de una serie de lavados para eliminar las partículas no unidas (que no reconozcan a nuestro antígeno), se recuperaron las partículas que sí lo reconocieron y por lo tanto se retuvieron en la placa durante los lavados.

Con las partículas virales recuperadas por selección con la hGH inmovilizada, infectó nuevamente la cepa de *E. coli* para amplificar la biblioteca y llevar a cabo una segunda ronda de exposición al antígeno. Estas rondas de selección se repitieron (“panning”) cuatro veces más para ir eliminando los fagos de menor afinidad hacia el antígeno.

Después de cuatro rondas de selección, se infectó *E. coli*, y se sembró en agar y se realizó una PCR en colonia para seleccionar colonias con inserto y extraer el fagémido que cargan, para finalmente, secuenciar sus insertos; esto con la finalidad de elegir las clonas con los insertos que poseen las secuencias

características de los VNARs y ausencia de mutaciones que generen codones de paro.

Para el monitoreo de las rondas de selección se hizo de dos maneras, mediante un ELISA de fagos y mediante el índice output/input. El primero consiste en una variante del ELISA directo en la cual se incuban los bacteriófagos de cada ronda en una placa con hGH adsorbida, después se realiza una serie de lavados; se incuba con un anticuerpo anti-fago marcado con HRP y se revela. La señal emitida debe aumentar conforme transcurren las rondas de selección. El segundo consiste en una relación entre el número de colonias transformantes obtenidas al infectar con los bacteriófagos eluidos después de la incubación y los lavados (output) y el número de transformantes al infectar con los bacteriófagos totales utilizados en cada ronda (input), este índice debe disminuir conforme transcurren las rondas.

#### **5.3.4 Tamizaje de una biblioteca nativa (UANL)**

Paralelamente al tamizaje de la biblioteca inmune se decidió tamizar una biblioteca nativa la cual fue construida por el Dr. en C. Oscar Raúl Fajardo Ramírez en su proyecto de tesis doctoral [91]. Para su tamizaje se utilizó la misma metodología que se utilizó para la biblioteca inmune.

Para la selección de clonas en este caso se probaron dos estrategias distintas, mediante secuenciación como en el caso anterior y directamente por expresión, para esto último se extrajeron los plásmidos de las bacterias de las últimas dos rondas y con ellos se transformó la cepa BL21 de *E. coli*, se sembró en placas



de cultivo con antibiótico, se levantaron colonias individuales y se hizo una inducción a pequeña escala para detectar la proteína producida mediante western-blot. Las clonas que al ser inducidas produjeron una proteína con un peso molecular de aproximadamente 13 kDa fueron enviadas a secuenciar para caracterizar su secuencia nucleotídica.

### **5.3.5 Producción en el laboratorio de VNARs candidatos (UANL)**

La cepa de *E. coli* BL21 fue transformada con los plásmidos con insertos correspondientes a VNARs y ausencia de codones de paro, esto para llevar a cabo la expresión de los VNARs contra hGH dado a que esta bacteria toma el codón Amber como un codón de paro. La inducción se hizo utilizando IPTG ya que el vector posee el promotor LacZ.

Una vez expresados fueron extraídos de periplasma mediante choque osmótico para proceder a los ensayos de reconocimiento.

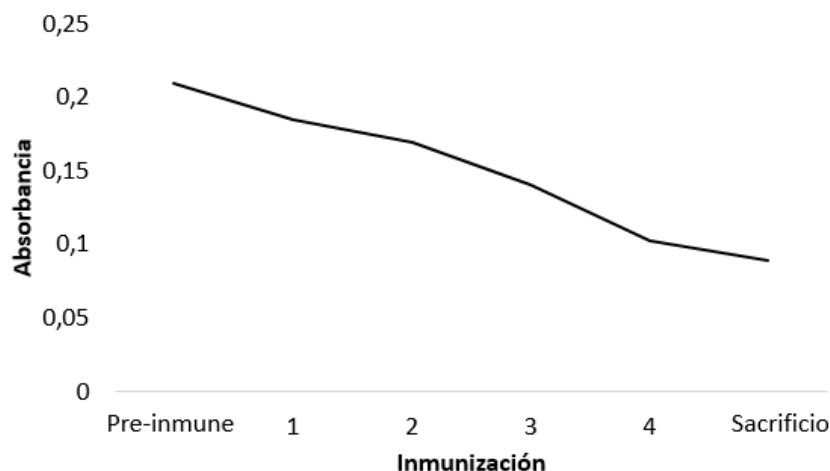
### **5.3.6 Evaluación de capacidad de reconocimiento de VNARs hacia la hGH (UANL)**

Esto se hizo mediante ELISA en donde los extractos periplásmicos se confrontaron contra la hGH adsorbida en una placa de 96 pozos para luminiscencia, se utilizaron anticuerpos anti-His6 para detectar los VNARs unidos a la hGH y se revelaron utilizando luminol.

## 6. Resultados

### 6.1 Inmunización de un tiburón de la especie *Heterodontus francisci*

Para evaluar la respuesta de las inmunizaciones se realizaron sangrados previos a cada una y pruebas de ELISA de los sueros confrontándolos contra la hGH. Contrario a lo esperado, conforme se avanzaba en las inmunizaciones, se observó una disminución de la respuesta del tiburón hacia la hGH. En la siguiente gráfica se muestra la respuesta del tiburón a través de las semanas del proceso de inmunización.



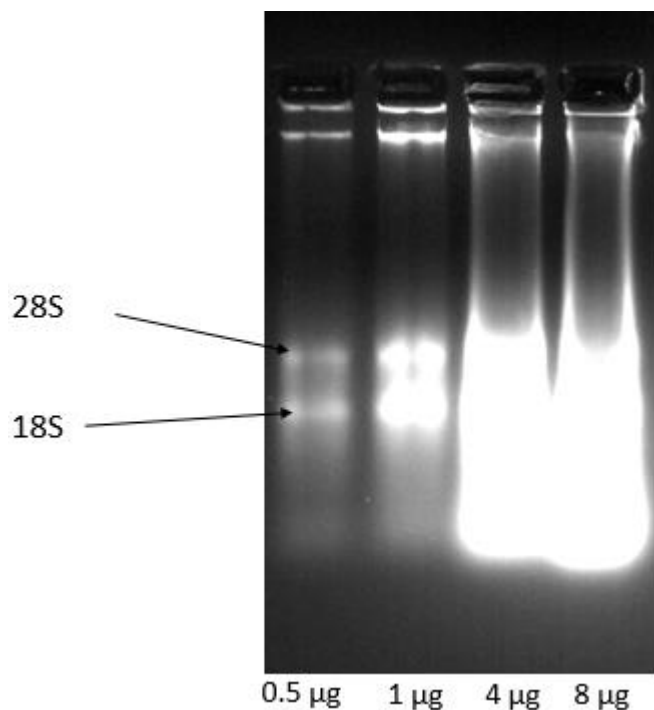
**Figura 3.** ELISA practicado al suero de tiburón.

### 6.2 Construcción de una biblioteca de bacteriófagos portadores de VNARs

#### 6.2.1 Extracción de ARNm

Después de la extracción de ARNm se corrió en un gel de agarosa el 1.5% (figura 4). Se pueden observar las bandas 28s y 18s que corresponden a las

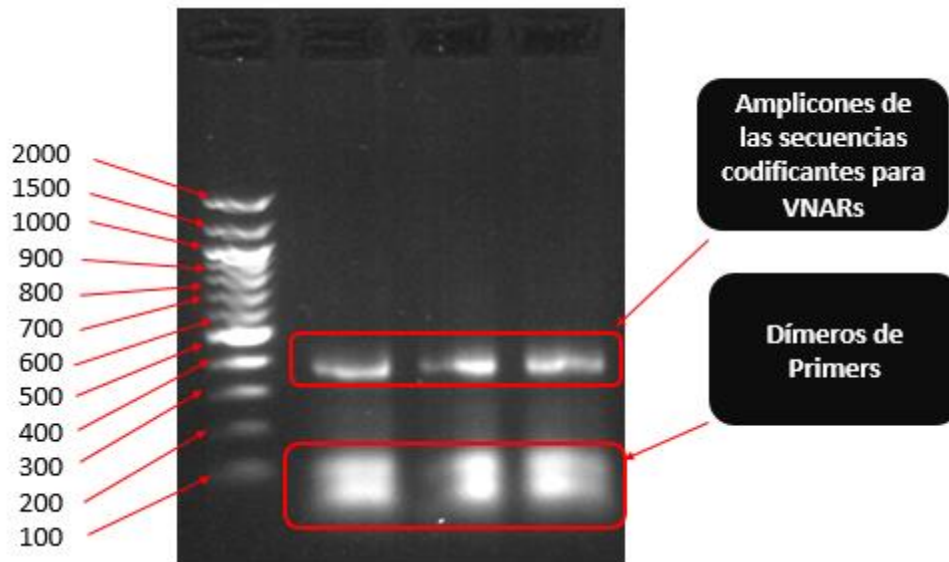
principales especies del ARN ribosomal, correspondiendo el barrido restante a las diversas especies de ARNms.



**Figura 4.** Extracción de ARN del bazo del tiburón. Se observan las bandas 28s y 18s. En cada carril se muestra la misma muestra pero cargada en cantidades de 0.5 µg, 1 µg, 4µg y 8 µg. La tinción fue hecha con bromuro de etidio y la visualización por irradiación con luz ultravioleta.

### 6.2.2 Conversión a ADNc mediante RT-PCR

El gel que se muestra a continuación muestra los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR que corresponden a las secuencias de los VNARs las cuales corresponden a las bandas de entre 400 y 500 pares de bases.



**Figura 5.** RT-PCR del ARNm del bazo del tiburón. Las bandas de entre 400 y 500 pares de bases corresponden a los VNARs. Del lado izquierdo se muestran los tamaños de las bandas del marcador. Se aprecian además bandas de aproximadamente 100 pares de bases que corresponden a dímeros de primers.

### 6.2.3 Ligación y transformación de *E. coli* ER2537

Con la ligación a pequeña escala se obtuvieron  $2.45 \times 10^7$  transformantes y haciendo el cálculo  $5 \times 10^7 / 2.45 \times 10^7$  se concluyó que se necesitaban 2 ligaciones para obtener la complejidad deseada. Con la ligación a gran escala se obtuvieron  $4 \times 10^7$  transformantes y con eso se prosiguió a las rondas de selección.

### **6.3 Seleccionar los VNARs candidatos con mayor afinidad hacia la hGH.**

#### **6.3.1 Monitoreo de las rondas de selección**

##### **6.3.1.1 Índice output/input**

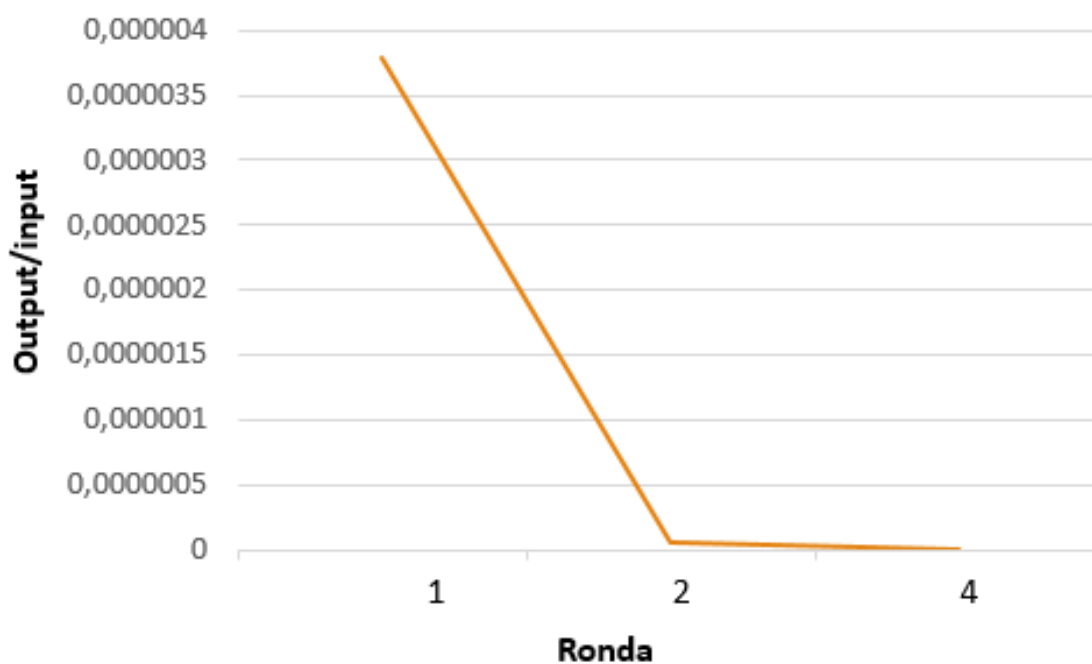
Se realizaron cuatro rondas de selección en la biblioteca inmune, los resultados del input y output se muestran a continuación:

Ronda 1	Ronda 2
Input: $1.1 \times 10^9$	Input: $2.05 \times 10^{11}$
Output: $4.16 \times 10^3$	Output: $1.34 \times 10^5$
Ronda 3	Ronda 4
Input: Incontable	Input: $1.89 \times 10^{11}$
Output: $2.64 \times 10^3$	Output: $2.4 \times 10^2$

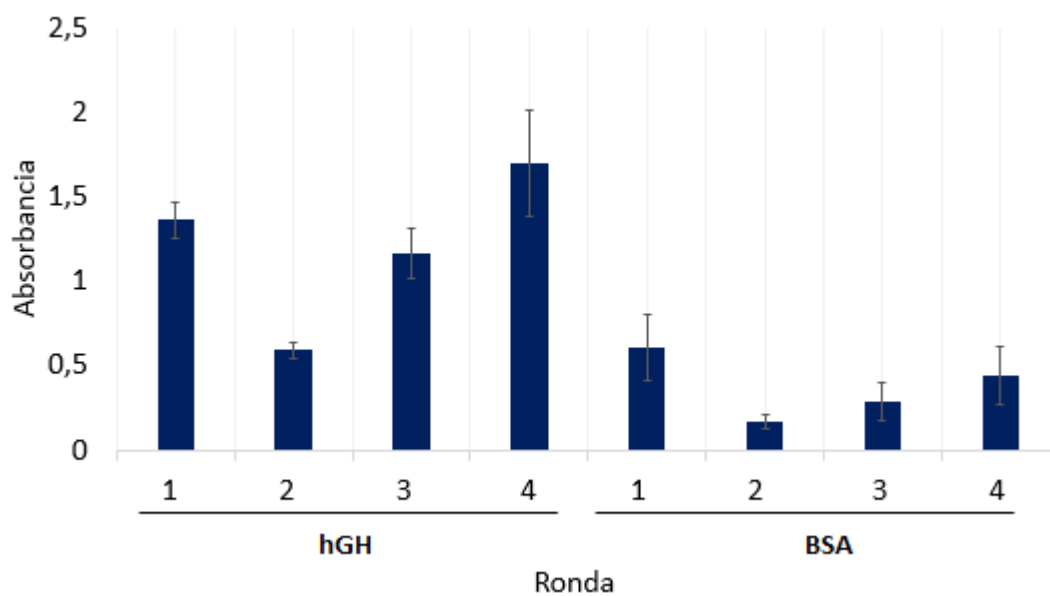
El índice output/input de las rondas de selección se expone en la figura 6. Contrario a lo esperado, el índice output/input fue en decremento.

##### **6.3.1.2 ELISA de fagos**

El resultado del ELISA de fagos se expone en la figura 7. Se observa que conforme transcurren las rondas de selección se incrementa la señal.



**Figura 6.** Índice output/input de las rondas de selección en la biblioteca inmune.



**Figura 7.** ELISA de fagos de las rondas de selección de la biblioteca inmune. Los fagos fueron confrontados contra hGH (lado izquierdo) y contra albúmina sérica bovina (BSA) como control negativo (lado derecho).

### 6.3.2 Selección de las clonas

La PCR en colonia muestra 27 colonias positivas (figura 8), a partir de las cuales se secuenciaron sus insertos. De estos, dos poseían las secuencias distintivas de los VNARs con ausencia de codones de paro, sin embargo estas secuencias ya habían sido previamente encontradas por el equipo de investigación en el CICESE, por lo que se sospechó de contaminantes. Las secuencias se mantienen confidenciales por fines de patente.

### 6.3.3 Tamizaje de una biblioteca nativa.

Se realizaron cuatro rondas de selección. A continuación se muestran los valores de input y output obtenidos. En la figura 9 se muestra una gráfica donde se expone el índice output/input.

Ronda 1

Input:  $4.7 \times 10^9$

Output:  $5.6 \times 10^4$

Ronda 2

Input:  $5.7 \times 10^9$

Output:  $4 \times 10^4$

Ronda 3

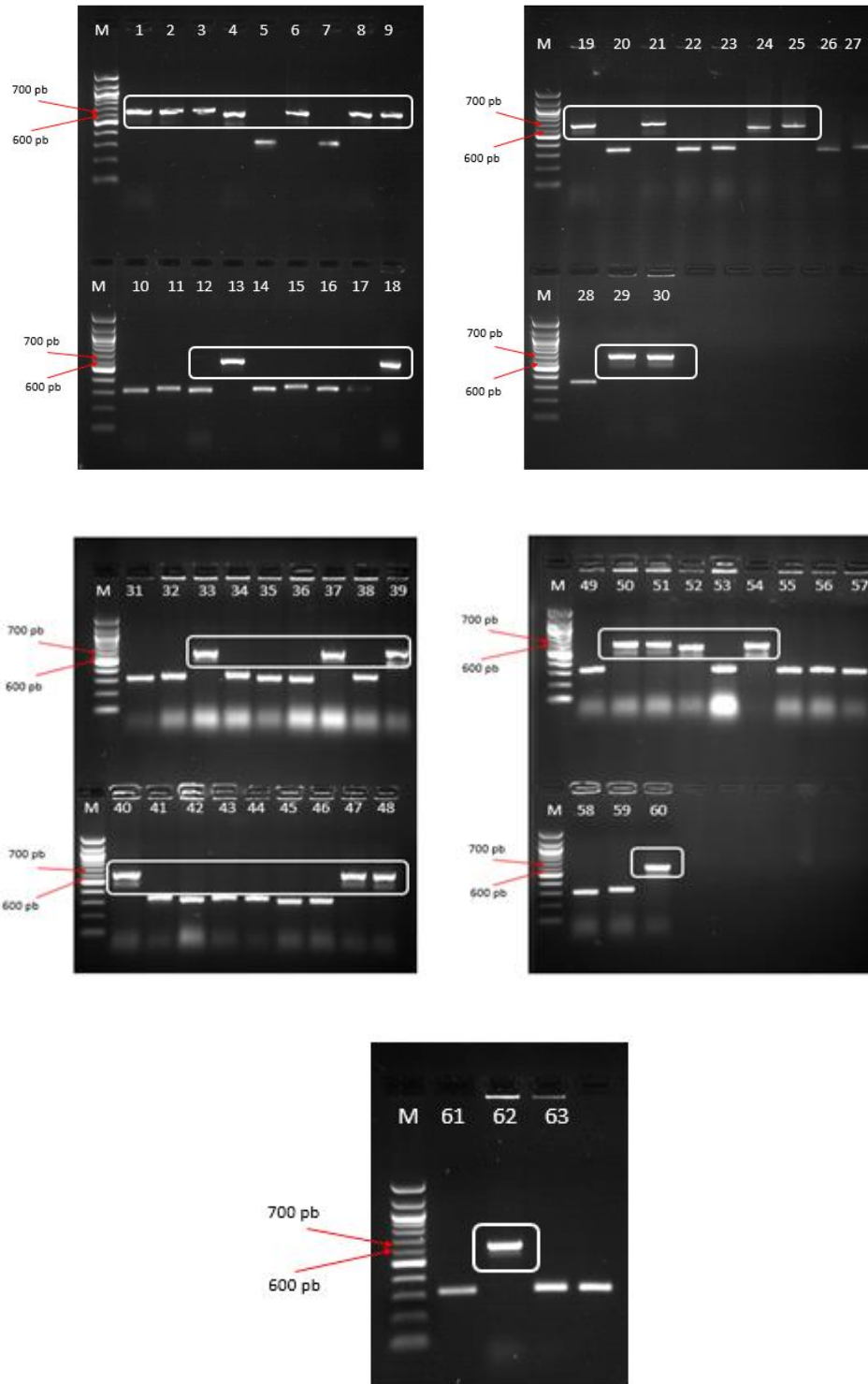
Input:  $2 \times 10^{11}$

Output:  $2.4 \times 10^5$

Ronda 4

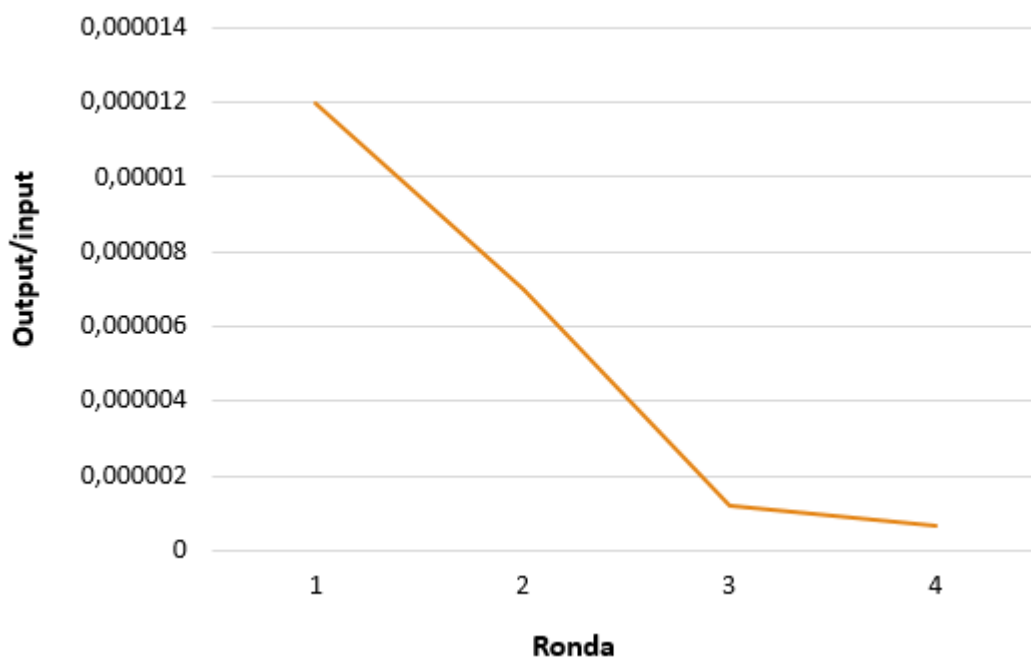
Input:  $6 \times 10^{10}$

Output:  $4 \times 10^4$



**Figura 8.** PCR en colonia de las clonas de las rondas de selección 3 y 4 de la biblioteca inmune. Las clonas con amplicones de entre 600 y 700 pb fueron enviadas a secuenciar. En los recuadros se señalan los amplicones de las clonas con el tamaño ya mencionado. Geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.





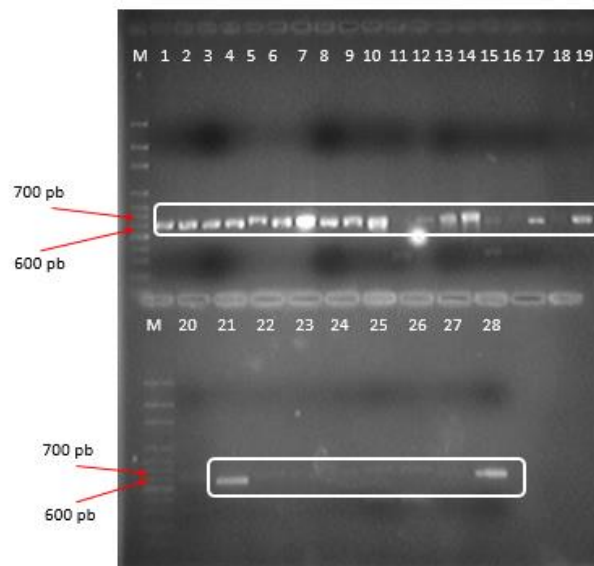
**Figura 9.** Índice output/input de las rondas de selección de la biblioteca nativa.

#### **6.3.3.1 Selección de las clonas por secuenciación**

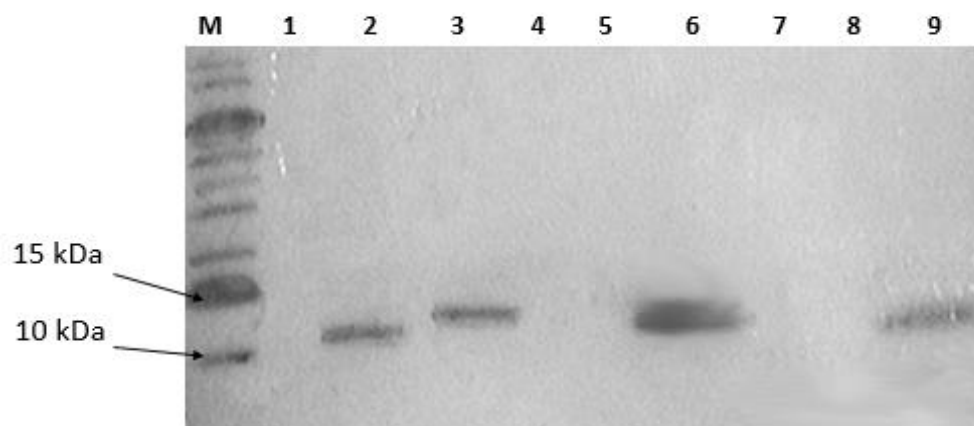
A partir de la PCR en colonia se obtuvieron 16 clonas positivas para inserto, las cuales fueron enviadas al secuenciarlas. De éstas, dos poseían las secuencias distintivas de los VNARs y ausencia de codones de paro.

#### **6.3.3.2 Selección de las clonas por producción**

Se transformó la cepa BL21 de *E. coli* con los plásmidos de las últimas dos rondas de selección y se sembraron en agar, de ahí se tomaron treinta y ocho colonias y se indujeron por separado, además de que también a la par, se realizó una inducción de las dos clonas seleccionadas por secuenciación. En la figura 11 se presenta el Western-blot de la selección por producción.



**Figura 10.** PCR en colonia de las clonas de las rondas de selección 3 y 4 de la biblioteca nativa. Las clonas con amplicones de entre 600 y 700 pb fueron enviadas a secuenciar, en los recuadros se señalan los amplicones de las clonas de con el tamaño ya mencionado. Gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.



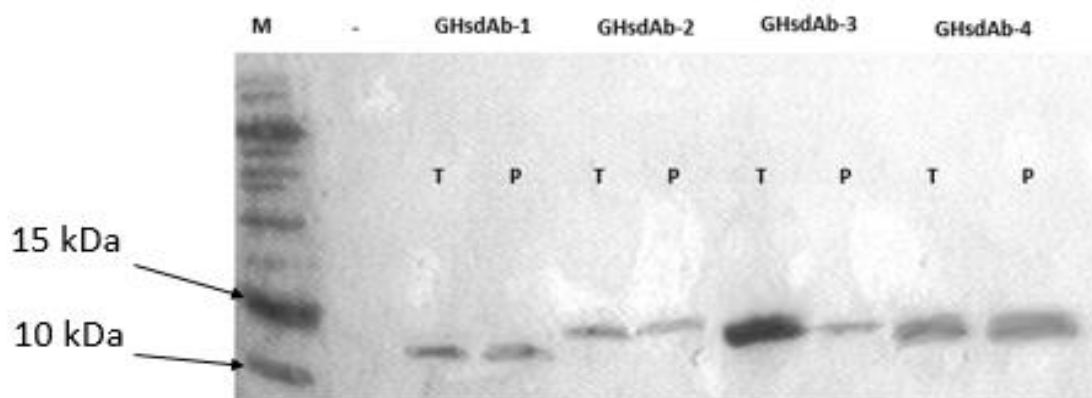
**Figura 11.** Western-blot de la selección por producción. El carril 1 corresponde al control negativo, los carriles 2 y 3 corresponden a las clonas previamente seleccionadas por secuenciación. Los carriles 6 y 9 corresponden a clonas seleccionadas por producción. El resto de los carriles corresponden a clonas no productoras. Nótese que los productos de la inducción presentan pesos moleculares distintos, lo cual se debe a las distintas longitudes de los sdAbs aislados. M= marcador de peso molecular.

Las clonas fueron nombradas GHsdAb-1, GHsdAb-2, GHsdAb-3 y GHsdAb-4, según el orden en que fueron identificadas.

La secuencia nucleotídica de los VNARs aislados fue traducida a proteína utilizando métodos bioinformáticos y entre ellos destaca una diferencia importante: la longitud de su CDR3. Ésta es de 10 aminoácidos en la clona GHsdAb-1, de 30 en la clona GHsdAb-2, de 14 en la clona GHsdAb-3 y de 18 en la clona GHsdab-4. Las secuencias se mantienen confidenciales por fines de patente.

#### 6.4 Producción de los VNARs candidatos en el laboratorio

En la siguiente imagen se muestra un Western-blot con el resultado de la inducción y la extracción de proteínas de periplasma.



**Figura 12.** Western-blot de la inducción y extracción de proteínas de periplasma. Las bandas corresponden a los VNARs producidos a partir de las cuatro clonas aisladas. Se puede apreciar la presencia de estos en periplasma. T= proteína total; P= proteína periplásmica; M= marcador; -: control negativo.

#### 6.5 Evaluar la capacidad de reconocimiento de la hGH

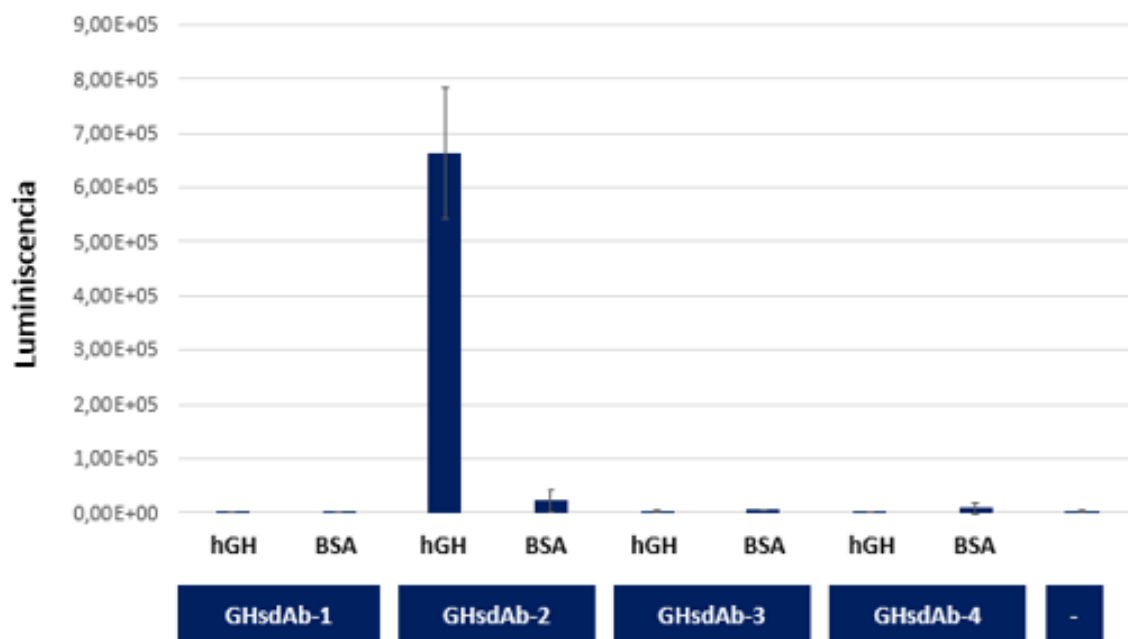
En la tabla 5 se muestran los resultados de la luminiscencia emitida por cada una de las clonas en el ensayo de ELISA de reconocimiento hacia la hGH.

**Tabla 5.** Luminiscencia emitida por las clonas obtenidas a partir de la biblioteca nativa.

	GHsdAb-1			GHsdAb-2			GHsdAb-3			GHsdAb-4		
hGH	1,32E+03	6,98E+02	2,49E+03	4,97E+05	7,12E+05	7,80E+05	2,52E+03	2,60E+03	1,99E+03	2,59E+03	1,65E+03	1,06E+03
BSA												
Control negativo	9,64E+02	2,08E+03	1,23E+03	5,90E+03	5,03E+04	1,03E+04	5,50E+03	5,50E+03	3,00E+03	9,66E+02	2,38E+04	2,87E+03

hGH: hormona de crecimiento humana; BSA: albúmina sérica bovina. El control negativo corresponde pozos donde se adsorbió hGH sin incubarla con el extracto periplásmico de ninguna de las clonas.

En la figura 13 se expresan en forma gráfica estos resultados.



**Figura 13.** Ensayo de reconocimiento de la hGH. La clona GHsdAb-2 mostró un nivel alto de luminiscencia al ser confrontada contra hGH en comparación con la luminiscencia obtenida al confrontarla contra BSA. hGH= hormona de crecimiento humana; BSA= albúmina sérica bovina.

## 7. Discusión

La baja respuesta inmune del tiburón contra la hGH pudo influir en los pobres resultados de las rondas de selección de la biblioteca inmune. Se sabe que el partir de una biblioteca nativa permite obtener sdAbs con capacidad de reconocimiento hacia algún antígeno deseado, sin embargo, se requiere una biblioteca de gran complejidad para lograr obtener anticuerpos con buena afinidad, por lo que es necesario verificar si la afinidad del sdAb aislado se encuentra en el nivel óptimo. De no ser el caso, sería indispensable realizar experimentos para madurar dicha afinidad [61].

El GHsdAb-2 aislado de la biblioteca nativa posee un CDR3 de 30 aminoácidos, longitud que pudo favorecer su afinidad por la hGH y puede condicionar su efecto antagónico sobre su la hGH, ya que se ha visto que la longitud del CDR3 influye en la capacidad inhibitoria de un VNAR sobre su blanco [92].

Previamente en un laboratorio en Siria se había desarrollado un sdAb contra hGH, aunque estando esta fusionada a la GFP superenrollada. Ellos aislaron cinco distintos sdAb con capacidad de reconocimiento hacia la hGH-GFP [80]. Comparando este resultado con el obtenido por nosotros se puede asumir que el haber partido ellos de una biblioteca inmune pudo ayudarles a encontrar más clonas candidatas y según lo reportado en la literatura, existe una alta probabilidad de que los sdAbs aislados por ellos posean mayor afinidad por la hGH que los aislados en nuestro laboratorio [61]. No obstante, harían falta estudios comparativos para probar o descartar esta hipótesis.

## 8. Conclusiones

Se logró obtener un sdAb con capacidad de reconocimiento hacia la hGH, que esta siendo evaluado como un nuevo antagonista de esta hormona.

La combinación de los métodos de tamizaje por expresión y por secuenciación permitió obtener un mayor número de clonas candidatas para los ensayos de reconocimiento y además, se comprobó la funcionalidad predicha por la secuencia.

La tecnología de despliegue de fagos es tan poderosa que inclusive se puede obtener anticuerpos con capacidad de reconocimiento hacia algún ligando a partir de una biblioteca no inmune.

## 9. Perspectivas

Se pretende continuar con la caracterización del resto de las clonas de la biblioteca con el fin de aumentar el número de candidatos. Se pretende además realizar pruebas de afinidad hacia la hGH con la plataforma biacore para corroborar que la afinidad por el antígeno se encuentre en niveles óptimos, de no ser así se realizarían ensayos de evolución *in-vitro* para madurar esta afinidad. Una vez concretado esto se procederá a optimizar la producción de los VNARs anti-hGH recombinantes obtener la cantidad suficiente para llevar a cabo los ensayos *in-vitro* en un modelo de diferenciación adipocítica con hGH e *in-vivo* en un modelo de rata hipofisectomizada.

## 10. Bibliografía

1. Harper ME, Barrera-Saldaña HA, Saunders GF. 1982. «Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24.» *Am J Hum Genet* 34 (2): 227-234.
2. Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldaña HA, Gelinas RE, Seeburg PH. 1989. «The human growth hormone locus: nucleotide sequence.» *Genomics* 4 (4): 479-497.
3. Barrera-Saldaña HA, Seeburg PH, Saunders GF. 1983. «Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone.» *J Biol Chem* 258 (6): 3787-3793.
4. Frohman, LA. 1996. «New insights into the regulation of somatotrope function using genetic and transgenic models.» *Metabolism* 5 ((8 Suppl 1)): 1-3.
5. Gröschl M, Knerr I, Topf HG, Schmid P, Rascher W, Rauh M. 2003. «Endocrine responses to the oral ingestion of a physiological dose of essential amino acids in humans.» *J Endocrinol* 179 (2): 237-244.
6. Zhang Y, Jiang J, Kopchick JJ, Frank SJ. 1999. «Disulfide linkage of growth hormone (GH) receptors (GHR) reflects GH-induced GHR dimerization. Association of JAK2 with the GHR is enhanced by receptor dimerization.» *J Biol Chem* 274 (46): 33072-33084.



7. Thorner MO, Vance ML, Evans WS, Ho K, Rogol AD, Blizzard RM, Furlanetto R, Rivier J, Vale W. 1986. «Growth hormone releasing factor and somatomedin C production: extrahypothalamic localization and possible functional significance.» *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 276: 34-40.
8. Talamantes F, Ortiz R. 2002. «Structure and regulation of expression of the mouse GH receptor.» *J Endocrinol* 175 (1): 55-59.
9. Kurimoto M, Fukuda I, Hizuka N, Takano K. 2008. «The prevalence of benign and malignant tumors in patients with acromegaly at a single institute.» *Endocr J* 55 (1): 67-71.
10. Saleem TF, Santhanam P, Hamoudeh E, Hassan T, Faiz S. 2012. «Acromegaly caused by growth hormone releasing hormone (GHRH) secreting tumor in multiple endocrine neoplasia (MEN-1).» *W V Med J* 108 (2): 26-30.
11. Hoffman WH, Perrin JC, Halac E, Gala RR, England BG. 1978. «Acromegalic gigantism and tuberous sclerosis.» *J Pediatr* 93 (3): 478-480.
12. Rojo Álvaro J, Martínez de Esteban JP, Pineda Arribas JJ, Ollero García-Agulló MD, Munárriz Alcuaz P. 2013. «Acromegaly in a patient with Carney's complex.» *Endocrinol Nutr* 60 (5): 277-278.
13. Salenave S, Boyce AM, Collins MT, Chanson P. 2014. «Acromegaly and McCune-Albright syndrome.» *J Clin Endocrinol Metab* 99 (6): 1955-1969.

14. Checa Garrido A, del Pozo Picó C. 2013. «Acromegaly and type 1 neurofibromatosis. Is association of both conditions due to chance?» *Endocrinol Nutr* 60 (3): 144-145.
15. Colak Ozbey N, Kapran Y, Bozbora A, Erbil Y, Tascioglu C, Asa S. 2009. «Ectopic growth hormone-releasing hormone secretion by a neuroendocrine tumor causing acromegaly: long-term follow-up results.» *Endocr Pathol* 20 (2): 127-132.
16. Khandelwal D, Khadgawat R, Mukund A, Suri A. 2011. «Acromegaly with no pituitary adenoma and no evidence of ectopic source.» *Indian J Endocrinol Metab* 15 (Suppl 3): 250-252.
17. Adams EF, Brockmeier S, Friedmann E, Roth M, Buchfelder M, Fahlbusch R. 1993. «Clinical and biochemical characteristics of acromegalic patients harboring gsp-positive and gsp-negative pituitary tumors.» *Neurosurgery* 33 (2): 198-203.
18. Melmed S, Casanueva FF, Klibanski A, Bronstein MD, Chanson P, Lamberts SW, Strasburger CJ, Wass JA, Giustina A. 2013. «A consensus on the diagnosis and treatment of acromegaly complications.» *Pituitary* 16 (3): 294-302.
19. Oshino S, Nishino A, Suzuki T, Arita H, Tateishi A, Matsumoto K, Shimokawa T, Kinoshita M, Yoshimine T, Saitoh Y. 2013. «Prevalence of cerebral aneurysm in patients with acromegaly.» *Pituitary* 16 (2): 195-201.

20. Yamamoto M, Fukuoka H, Iguchi G, Matsumoto R, Takahashi M, Nishizawa H, Suda K, Bando H, Takahashi Y. 2014. «The prevalence and associated factors of colorectal neoplasms in acromegaly: a single center based study.» *Pituitary* 18 (3): 343-351.
21. Berg C, Petersenn S, Lahner H, Herrmann BL, Buchfelder M, Droste M, Stalla GK, Strasburger CJ, Roggenbuck U, Lehmann N, Moebus S, Jöckel KH, Möhlenkamp S, Erbel R, Saller B, Mann K. 2010. «Cardiovascular risk factors in patients with uncontrolled and long-term acromegaly: comparison with matched data from the general population and the effect of disease control.» *J Clin Endocrinol Metab* 95 (8): 3648-3656.
22. Stelmachowska-Banaś M, Zdunowski P, Zgliczyński W. 2009.  
«Abnormalities in glucose homeostasis in acromegaly. Does the prevalence of glucose intolerance depend on the level of activity of the disease and the duration of the symptoms?» *Endokrynol Pol* 60 (1): 20-24.
23. Dworakowska D, Gueorguiev M, Kelly P, Monson JP, Besser GM, Chew SL, Akker SA, Drake WM, Fairclough PD, Grossman AB, Jenkins PJ. 2010.  
«Repeated colonoscopic screening of patients with acromegaly: 15-year experience identifies those at risk of new colonic neoplasia and allows for effective screening guidelines.» *Eur J Endocrinol* 163 (1): 21-28.
24. Pantanetti P, Sonino N, Arnaldi G, Boscaro M. 2002. «Self image and quality of life in acromegaly.» *Pituitary* 5 (1): 17-19.

25. Fava GA, Sonino N, Morphy MA. 1993. «Psychosomatic view of endocrine disorders.» *Psychother Psychosom* (59) 1: 20-33.
26. Holdaway IM, Bolland MJ, Gamble GD. 2008. «A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly.» *Eur J Endocrinol* 159 (2): 89-95.
27. Lombardi S, Honeth G, Ginestier C, Shinomiya I, Marlow R, Buchupalli B, Gazinska P, Brown J, Catchpole S, Liu S, Barkan A, Wicha M, Purushotham A, Burchell J, Pinder S, Dontu G. 2014. «Growth hormone is secreted by normal breast epithelium upon progesterone stimulation and increases proliferation of stem/progenitor cells.» *Stem Cell Reports* 780-793.
28. Zhou D, Yang J, Huang WD, Wang J, Zhang Q. 2013. «siRNA-targeted inhibition of growth hormone receptor in human colon cancer SW480 cells.» *World J Gastroenterol* 8108-8113.
29. Subramani R, Lopez-Valdez R, Salcido A, Boopalan T, Arumugam A, Nandy S, Lakshmanaswamy R. 2014. «Growth hormone receptor inhibition decreases the growth and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma.» *Exp Mol Med* e117.
30. Sustarsic EG, Junnila RK, Kopchick JJ. 2013. «Human metastatic melanoma cell lines express high levels of growth hormone receptor and respond to GH treatment.» *Biochem Biophys Res Commun* 144-150.
31. Li Q, You C, Liu L, Rao Z, Sima X, Zhou L, Xu J. 2013. «Craniopharyngioma cell growth is promoted by growth hormone (GH) and is inhibited by

tamoxifen: involvement of growth hormone receptor (GHR) and IGF-1 receptor (IGF-1R).» *J Clin Neurosci* 153-157.

32. Nakonechnaya AO, Jefferson HS, Chen X, Shewchuk BM. 2013.

«Differential effects of exogenous and autocrine growth hormone on LNCaP prostate cancer cell proliferation and survival.» *J Cell Biochem* 1322-1335.

33. Katznelson L, Atkinson JL, Cook DM, Ezzat SZ, Hamrahian AH, Miller KK.

2011. «Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of acromegaly–2011 update.» *Endocr Pract* 17 ((suppl 4)): 1-44.

34. Caron PJ, Bevan JS, Petersenn S, Flanagan D, Tabarin A, Prévost G,

Maisonobe P, Clermont A, y PRIMARYS Investigators. 2014. «Tumor shrinkage with lanreotide Autogel 120 mg as primary therapy in acromegaly: results of a prospective multicenter clinical trial.» *J Clin Endocrinol Metab* 99 (4): 1282-1290.

35. Colao A, Bronstein MD, Freda P, Gu F, Shen CC, Gadelha M, Fleseriu M,

van der Lely AJ, Farrall AJ, Hermosillo Reséndiz K, Ruffin M, Chen Y, Sheppard M, y Pasireotide C2305 Study Group. 2014. «Pasireotide versus octreotide in acromegaly: a head-to-head superiority study.» *J Clin Endocrinol Metab* 99 (3): 791-799.

36. Melmed S, Cook D, Schopohl J, Goth MI, Lam KS, Marek J. 2010. «Rapid

and sustained reduction of serum growth hormone and insulin-like growth factor-1 in patients with acromegaly receiving lanreotide Autogel therapy: a

randomized, placebo-controlled, multicenter study with a 52 week open extension.» *Pituitary* (13) 1: 18-28.

37. Mercado M, Borges F, Bouterfa H, Chang TC, Chervin A, Farrall AJ, Patocs A, Petersenn S, Podoba J, Safari M, Wardlaw J, y SMS995B2401 Study Group. 2007. «A prospective, multicentre study to investigate the efficacy, safety and tolerability of octreotide LAR (long-acting repeatable octreotide) in the primary therapy of patients with acromegaly.» *Clin Endocrinol (Oxf)* 66 (6): 859-868.
38. Attanasio R, Mainolfi A, Grimaldi F, Cozzi R, Montini M, Carzaniga C, Grottoli S, Cortesi L, Albizzi M, Testa RM, Fatti L, De Giorgio D, Scaroni C, Cavagnini F, Loli P, Pagani G, Ghigo E. 2008. «Somatostatin analogs and gallstones: a retrospective survey on a large series of acromegalic patients.» *J Endocrinol Invest* 31 (8): 704-710.
39. Pradhananga S, Wilkinson I, Ross RJ. 2002. «Pegvisomant: structure and function.» *J Mol Endocrinol* 29 (1): 11-14.
40. Kopchick JJ, Parkinson C, Stevens EC, Trainer PJ. 2002. «Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly.» *Endocr Rev* 23 (5): 623-646.
41. Chen WY, Wight DC, Wagner TE, Kopchick JJ. 1990. «Expression of a mutated bovine growth hormone gene suppresses growth of transgenic mice.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (13): 5061-5065.

42. Chen WY, Chen NY, Yun J, Wagner TE, Kopchick JJ. 1994. «In vitro and in vivo studies of antagonistic effects of human growth hormone analogs.» *J Biol Chem* 269 (22): 15892-15897.
43. Lowman HB, Wells JA. 1993. «Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display.» *J Mol Biol* 234 (3): 5.
44. Cunningham BC, Lowman HB, Wells JA, Clark RG, Olson K, Fuh G. 1998. Human growth hormone variants . US Patente 5849535. 15 de Dic.
45. Ross RJ, Leung KC, Maamra M, Bennett W, Doyle N, Waters MJ, Ho KK. 2001. «Binding and functional studies with the growth hormone receptor antagonist, B2036-PEG (pegvisomant), reveal effects of pegylation and evidence that it binds to a receptor dimer.» *J Clin Endocrinol Metab* 86 (4): 1716-1723.
46. Goffin V, Bernichtein S, Carrière O, Bennett WF, Kopchick JJ, Kelly PA. 1999. «The human growth hormone antagonist B2036 does not interact with the prolactin receptor.» *Endocrinology* 140 (8): 3853-3856.
47. van der Lely AJ, Biller BM, Brue T, Buchfelder M, Ghigo E, Gomez R, Hey-Hadavi J, Lundgren F, Rajcic N, Strasburger CJ, Webb SM, Koltowska-Häggström M. 2012. «Long-term safety of pegvisomant in patients with acromegaly: comprehensive review of 1288 subjects in ACROSTUDY.» *J Clin Endocrinol Metab* 97 (5): 1589-1597.
48. Castinetti F, Nagai M, Morange I, Dufour H, Caron P, Chanson P, Cortet-Rudelli C, Kuhn JM, Conte-Devolx B, Regis J, Brue T. 2009. «Long-term

- results of stereotactic radiosurgery in secretory pituitary adenomas.» *J Clin Endocrinol Metab* 94 (9): 3400-3407.
49. Frohman LA, Bonert V. 2007. «Pituitary tumor enlargement in two patients with acromegaly during pegvisomant therapy.» *Pituitary* 10 (3): 283-289.
50. Schreiber I, Buchfelder M, Droste M, Forssmann K, Mann K, Saller B, Strasburger CJ, y German Pegvisomant Investigators. 2007. «Treatment of acromegaly with the GH receptor antagonist pegvisomant in clinical practice: safety and efficacy evaluation from the German Pegvisomant Observational Study.» *Eur J Endocrinol* 156 (1): 75-82.
51. Abs R, Verhelst J, Maiter D, Van Acker K, Nobels F, Coolens JL, Mahler C, Beckers A. 1998. «Cabergoline in the treatment of acromegaly: a study in 64 patients.» *J Clin Endocrinol Metab* 83 (2): 374-378.
52. Sandret L, Maison P, Chanson P. 2011. «Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis.» *J Clin Endocrinol Metab* 96 (5): 1327-1335.
53. Freda PU, Reyes CM, Nuruzzaman AT, Sundeen RE, Khandji AG, Post KD. 2004. «Cabergoline therapy of growth hormone & growth hormone/prolactin secreting pituitary tumors.» *Pituitary* 7 (1): 21-30.
54. Neggers SJ, de Herder WW, Janssen JA, Feelders RA, van der Lely AJ. 2009. «Combined treatment for acromegaly with long-acting somatostatin analogs and pegvisomant: long-term safety for up to 4.5 years (median 2.2 years) of follow-up in 86 patients.» *Eur J Endocrinol* 160 (4): 529-533.



55. Higham CE, Atkinson AB, Aylwin S, Bidlingmaier M, Drake WM, Lewis A, Martin NM, Moyes V, Newell-Price J, Trainer PJ. 2012. «Effective combination treatment with cabergoline and low-dose pegvisomant in active acromegaly: a prospective clinical trial.» *J Clin Endocrinol Metab* 97 (4): 1187-1193.
56. Neggers SJ, van Aken MO, de Herder WW, Feelders RA, Janssen JA, Badia X, Webb SM, van der Lely AJ. 2008. «Quality of life in acromegalic patients during long-term somatostatin analog treatment with and without pegvisomant.» *J Clin Endocrinol Metab* 93 (10): 3853-3839.
57. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. 1993. «Naturally occurring antibodies devoid of light chains.» *Nature* 363 (6428): 446-448.
58. Muyldermans, S. 2001. «Single domain camel antibodies: current status.» *J Biotechnol* 277-302.
59. Diaz M, Stanfield RL, Greenberg AS, Flajnik MF. 2002. «Structural analysis, selection, and ontogeny of the shark new antigen receptor (IgNAR): identification of a new locus preferentially expressed in early development.» *Immunogenetics* 54 (7): 501-512.
60. Köhler G, Milstein C. 1975. «Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.» *Nature* 256 (5517): 495-497.
61. Kim SJ, Park Y, Hong HJ. 2005. «Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies.» *Mol Cells* 20 (1): 17-29.

62. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. 1984. «Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (21): 6851-6855.
63. Popma JJ, Satler LF. 1994. «Early and late clinical outcome following coronary angioplasty performed with platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition: the EPIC Trial results.» *J Invasive Cardiol* 6 (Suppl A): 19A-28A.
64. Bell SJ, Kamm MA. 2000. «Review article: the clinical role of anti-TNFalpha antibody treatment in Crohn's disease.» *Aliment Pharmacol Ther* 14 (5): 501-514.
65. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. 1986. «Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse.» *Nature* 321 (6069): 522-525.
66. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. 1988. «Single-chain antigen-binding proteins.» *Science* 242 (4877): 423-426.
67. Brinkmann U, Reiter Y, Jung SH, Lee B, Pastan I. 1993. «A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (16): 7538-7542.
68. Holliger P, Prospero T, Winter G. 1993. «Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments.» *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (14): 6444-6448.

69. Bera TK, Onda M, Brinkmann U, Pastan I. 1998. «A bivalent disulfide-stabilized Fv with improved antigen binding to erbB2.» *J Mol Biol* 281 (3): 475-483.
70. Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM. 1996. «Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts.» *Cancer Res* 56 (13): 3055-61.
71. Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, Leprini A, Borsi L, Castellani P, Zardi L, Neri D, Riva P. 2003. «Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer.» *Clin Cancer Res* 9 (2): 571-579.
72. Kim DY, Hussack G, Kandalaft H, Tanha J. 2014. «Mutational approaches to improve the biophysical properties of human single-domain antibodies.» *Biochim Biophys Acta*.
73. Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. 1989. «Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*.» *Nature* 341 (6242): 544-546.
74. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. 1997. «Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies.» *FEBS Lett* 414 (3): 521-526.
75. Fatima A, Wang H, Kang K, Xia L, Wang Y, Ye W, Wang J, Wang X. 2014. «Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and

comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis.» *PLoS One* 9 (4): e95263.

76. Wu W, Li S, Zhang W, Sun J, Ren G, Dong Q. 2014. «A novel VHH antibody targeting the B cell-activating factor for B-cell lymphoma.» *Int J Mol Sci* 15 (6): 9481-9496.
77. Paniagua-Solís JF, MATA-GONZÁLEZ MT, GARCÍA-UBBELOHDEWJ, OLGUÍN-JIMENEZ A, Licea-Navarro AF, Camacho-Villegas TA, Sanchez-Castrejon E. 2013. VHNAR anti-cytokine domains. US Patente 8496933 B2. 30 de Jul.
78. Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D. 2012. Single-domain brain-targeting antibody fragments derived from llama antibodies. CA Patente 2441903 C. 31 de Jul.
79. Silence, Karen. 2004. RECOMBINANT VHH SINGLE DOMAIN ANTIBODY FROM CAMELIDAE AGAINST VON WILLEBRAND FACTOR (vWF) OR AGAINST COLLAGEN. WO Patente 2004062551 A3. 2 de Sep.
80. Abbady AQ, Al-Shemali R, Mir Assaad J, Murad H. 2014. «Generation and characterization of nanobodies against rhGH expressed as sfGFP fusion protein.» *Gen Comp Endocrinol* 204: 33-42.
81. Carlos F. Barbas, Dennis R. Burton, Jamie K. Scott, Gregg J. Silverman. 2001. *Phage Display A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

82. Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ. 1994 Jul. «Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires.» *EMBO J* 13 (14): 3245-3260.
83. Huls GA, Heijnen IA, Cuomo ME, Koningsberger JC, Wiegman L, Boel E, van der Vuurst de Vries AR, Loyson SA, Helfrich W, van Berge Henegouwen GP, van Meijer M, de Kruif J, Logtenberg T. 1999. «A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments.» *Nat Biotechnol* 17 (3): 276-281.
84. Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer G, Hoess A, Wölle J, Plückthun A, Virnekäs B. 2000. «Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides.» *J Mol Biol* 296 (1): 57-86.
85. Boder ET, Wittrup KD. 1997. «Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries.» *Nat Biotechnol* 15 (6): 553-557.
86. Francisco JA, Campbell R, Iverson BL, Georgiou G. 1993. «Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (22): 10444-10448.

87. Fuchs P, Breitling F, Dübel S, Seehaus T, Little M. 1991 . «Targeting recombinant antibodies to the surface of Escherichia coli: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein.» *Biotechnology (N Y)* 9 (12): 1369-72.
88. Georgiou G, Stathopoulos C, Daugherty PS, Nayak AR, Iverson BL, Curtiss R 3rd. 1997. «Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines.» *Nat Biotechnol* 15 (1): 29-34.
89. Gunneriusson E, Samuelson P, Uhlen M, Nygren PA, Ståhl S. 1996. «Surface display of a functional single-chain Fv antibody on staphylococci.» *J Bacteriol* 178 (5): 1341-6.
90. Fleetwood F, Devoogdt N, Pellis M, Wernery U, Muyldermans S, Ståhl S, Löfblom J. 2013. «Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria.» *Cell Mol Life Sci* 70 (6): 1081-1093.
91. Fajardo Ramirez, Oscar Raul. 2014. «Generación de un anticuerpo bi-específico anti-CD19 y CD16 mediador de citotoxicidad tumoral CD16 dependiente.» Monterrey, Nuevo León, Julio.
92. Kovalenko OV, Olland A, Piché-Nicholas N, Godbole A, King D, Svenson K, Calabro V, Müller MR, Barelle CJ, Somers W, Gill DS, Mosyak L, Tchistiakova L. 2013. «Atypical antigen recognition mode of a shark immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR) variable domain characterized by humanization and structural analysis.» *J Biol Chem* 288 (24): 17408-17419.

93. Jane JA Jr, Starke RM, Elzoghby MA, Reames DL, Payne SC, Thorner MO, Marshall JC, Laws ER Jr, Vance ML. 2011. «Endoscopic transsphenoidal surgery for acromegaly: remission using modern criteria, complications, and predictors of outcome.» *J Clin Endocrinol Metab* 96 (9): 2732-2740.
94. Zada G, Cavallo LM, Esposito F, Fernandez-Jimenez JC, Tasiou A, De Angelis M, Cafiero T, Cappabianca P, Laws ER. 2010. «Transsphenoidal surgery in patients with acromegaly: operative strategies for overcoming technically challenging anatomical variations.» *Neurosurg Focus* 29 (4): E8.
95. Cappabianca P, Cavallo LM, Colao A, de Divitiis E. 2002. «Surgical complications associated with the endoscopic endonasal transsphenoidal approach for pituitary adenomas.» *J Neurosurg* 97 (2): 293-298.
96. Starke RM, Raper DM, Payne SC, Vance ML, Oldfield EH, Jane JA Jr. 2013. «Endoscopic vs microsurgical transsphenoidal surgery for acromegaly: outcomes in a concurrent series of patients using modern criteria for remission.» *J Clin Endocrinol Metab* 98 (8): 3190-3198.
97. Kreutzer J, Vance ML, Lopes MB, Laws ER Jr. 2001. «Surgical management of GH-secreting pituitary adenomas: an outcome study using modern remission criteria.» *J Clin Endocrinol Metab* 86 (9): 4072-4077.
98. Nomikos P, Buchfelder M, Fahlbusch R. 2005. «The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical 'cure'.» *Eur J Endocrinol* 152 (3): 379-387.

99. Katznelson L, Laws ER Jr, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, Wass JA, y Endocrine Society. 2014. «Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline.» *J Clin Endocrinol Metab* 99 (11): 3933-3951.